



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

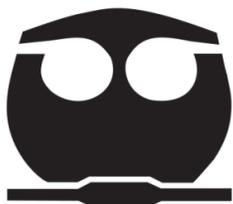
FACULTAD DE QUÍMICA

“Genes regulados por Prolactina durante la maduración de los linfocitos B de médula ósea, en ratones que desarrollan una enfermedad similar al Lupus Eritematoso Sistémico”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
LILIANA APOLINAR GUTIÉRREZ.**



MÉXICO, D.F.

AÑO 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: Profesora: Berrón Ruiz Patricia Elvira.
VOCAL: Profesora: Heras Chavarría Mónica Berenice.
SECRETARIO: Profesora: Chávez Rueda Adriana Karina.
1er. SUPLENTE: Profesora: Pérez Tapia Sonia Mayra.
2° SUPLENTE: Profesor: Moreno Eutimio Mario Adán.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Este trabajo fue financiado por el Fondo de Investigación en Salud (FIS/IMSS/PROT/G12/1118) y el CONACYT (150766).

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

SUSTENTANTE:

Liliana Apolinar Gutiérrez

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Diferenciación de las células B en médula ósea.....	3
Regulación del desarrollo de los linfocitos B	7
Mecanismos de tolerancia	9
Lupus eritematoso sistémico	11
Prolactina.....	12
Receptor de prolactina	14
Sistema inmune y PRL.....	17
Prolactina y LES	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
DIAGRAMA DE FLUJO.....	31
RESULTADOS.....	32
Purificación de linfocitos B.....	32
Expresión del receptor de PRL	33
Genes modulados por prolactina.....	33
Selección de genes.....	34

Expresión relativa del gen Ikzf1	41
Expresión relativa del gen Birc5.....	42
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS.....	51
ANEXO	52
REFERENCIAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desarrollo de células B	4
Figura 2	Recombinación de los genes que codifican la cadena IgH e IgL	5
Figura 3	Regulación en la diferenciación de linfocitos B	8
Figura 4	Mecanismos de tolerancia en linfocitos B	11
Figura 5	Estructura tridimensional del complejo PRL - receptor de PRL	13
Figura 6	Gen de la PRL	14
Figura 7	Principales vías de señalización del receptor de PRL	15
Figura 8	Purificación de linfocitos B inmaduros	32
Figura 9	Expresión del receptor de PRL	33
Figura 10	Genes modulados por la prolactina	34
Figura 11	Expresión relativa del gen Ikzf1 (Ikaros)	42
Figura 12	Expresión relativa del gen Birc5	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Genes modulados por PRL a 1hr de incubación, maduración de linfocitos B	35
Tabla 2	Genes modulados por PRL a 2hrs de incubación, maduración de linfocitos B	35
Tabla 3	Genes modulados por PRL a 4hrs de incubación, maduración de linfocitos B	36
Tabla 4	Genes modulados por PRL a 1hr de incubación, vía de señalización de NFκB	37
Tabla 5	Genes modulados por PRL a 2hrs de incubación, vía de señalización de NFκB	37
Tabla 6	Genes modulados por PRL a 4hrs de incubación, vía de señalización de NFκB	38
Tabla 7	Genes modulados por PRL a 1hr de incubación, vía de señalización MAPK	38
Tabla 8	Genes modulados por PRL a 4hrs de incubación, vía de señalización MAPK	39
Tabla 9	Genes modulados por PRL a 4hrs de incubación, vía de señalización Jak/Stat	39
Tabla 10	Genes modulados por PRL a 1hr de incubación, apoptosis	39
Tabla 11	Genes modulados por PRL a 2hrs de incubación, apoptosis	40
Tabla 12	Genes modulados por PRL a 4hrs de incubación, apoptosis	40

ABREVIATURAS

BCR	Receptor de linfocito B
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Molécula de diferenciación
cDNA	DNA complementario
CLP	Progenitor linfoide común
CPH	Célula progenitora hematopoyética
CTH	Célula troncal hematopoyética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
ELP	Progenitor linfoide temprano
Ig	Inmunoglobulina
IgH	Cadena pesada de la inmunoglobulina
IgL	Cadena ligera de la inmunoglobulina
IL	Interleucina
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LES	Lupus eritematoso sistémico
mRNA	RNA mensajero
NK	Célula natural killer
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
T1	Linfocito B transitorio 1
T2	Linfocito B transitorio 2
T3	Linfocito B transitorio 3
TNF	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Introducción. La ontogenia del linfocito B inicia en médula ósea y finaliza en bazo. A lo largo de este proceso se requieren de diferentes señales y factores de transcripción que en conjunto reclutan proteínas que activan genes del linaje B o reprimen genes asociados a otros linajes. Un paso importante durante la maduración de los linfocitos B es la eliminación de las clonas auto-reactivas a través de mecanismos de tolerancia, la falla en estos mecanismos contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES). LES afecta predominantemente a mujeres en edad reproductiva, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas, como la prolactina (PRL). En ensayos clínicos se ha descrito que concentraciones séricas altas de PRL correlacionan con mayor actividad de la enfermedad. En modelos de ratón (NZB/NZW, MRL, MRL/lpr) utilizados para entender mejor la patología de LES, al inducirles un estado de hiperprolactinemia se exacerba la enfermedad, entre ellas la producción de auto-anticuerpos. Además, se ha reportado que la PRL puede afectar los mecanismos de delección clonal y anergia en bazo.

Objetivo. Determinar los genes regulados por la PRL en linfocitos B de médula ósea, de ratones MRL/lpr que desarrollan una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico.

Material y métodos. Se purificaron linfocitos B de médula ósea de la cepa MRL/lpr, posteriormente se incubaron con PRL por diferentes periodos (1, 2 y 4hrs), al término de cada tiempo se realizó la extracción de mRNA y se envió al Instituto de Fisiología Celular (UNAM) para realizar los microarreglos. Los resultados de los microarreglos fueron analizados utilizando los programas bioinformáticos: GenArise y David Bioinformatics. Se seleccionaron 2 genes y su expresión se comprobó a través de RT-PCR tiempo real en la cepa control (C57BL/6) y en dos cepas que desarrollan LES (MRL, MRL/lpr).

Resultados y discusión. Los linfocitos B de médula ósea expresan el receptor de PRL, la interacción de la PRL con su receptor induce una retroalimentación positiva al incrementar la expresión del gen de la hormona y su receptor. Esta interacción indujo la sobre-expresión de genes involucrados en las cascadas de señalización MAPK (MAPK9, MAPK8, c-Jun), Jak/Stat (Jak2) y NFκB (TRAF6, NFKBIZ, TANK, p52). Además de genes involucrados en el re-arreglo de genes de las cadenas de las inmunoglobulinas (IgK-V21,IGH), en la maduración de los linfocitos (Blnk, Ikzf) y en la apoptosis (Birc5, Bad, Bmf). De los genes modificados con un nivel significativo se seleccionaron 2, Ikzf1 y Birc5, ambos tienen una mayor expresión al ser estimulados con PRL en cepas que desarrollan lupus con respecto a la cepa control.

Conclusión. Estos resultados sugieren una participación de la PRL en el proceso de maduración de los linfocitos B en médula ósea.

INTRODUCCIÓN

Diferenciación de las células B en médula ósea.

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) tienen dos características funcionales que las distinguen de las demás células, son capaces de auto-renovarse (división simétrica), al dividirse por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre y son multipotenciales (división asimétrica) pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos. Las CTH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales) como el linaje linfoide, el cual inicia con el progenitor linfoide temprano (ELP, del inglés early lymphoid progenitors). Los ELPs dan origen a los progenitores linfoides comunes o CLPs, que son reconocidos como los más eficientes precursores de linfocitos B y células NK en médula ósea (Mayani y col., 2007; Rodak, 2005).

Los CLPs pasan por diferentes estadios hasta llegar a linfocitos B inmaduros, los cuales salen a la periferia y llegan a bazo donde terminan su maduración. Los distintos estadios de maduración del linfocito B se pueden diferenciar por la expresión de moléculas de superficie (fenotipo) y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y ligera (IgL) (Kindt y col., 2007; Abbas y col., 2012) (Figura 1).

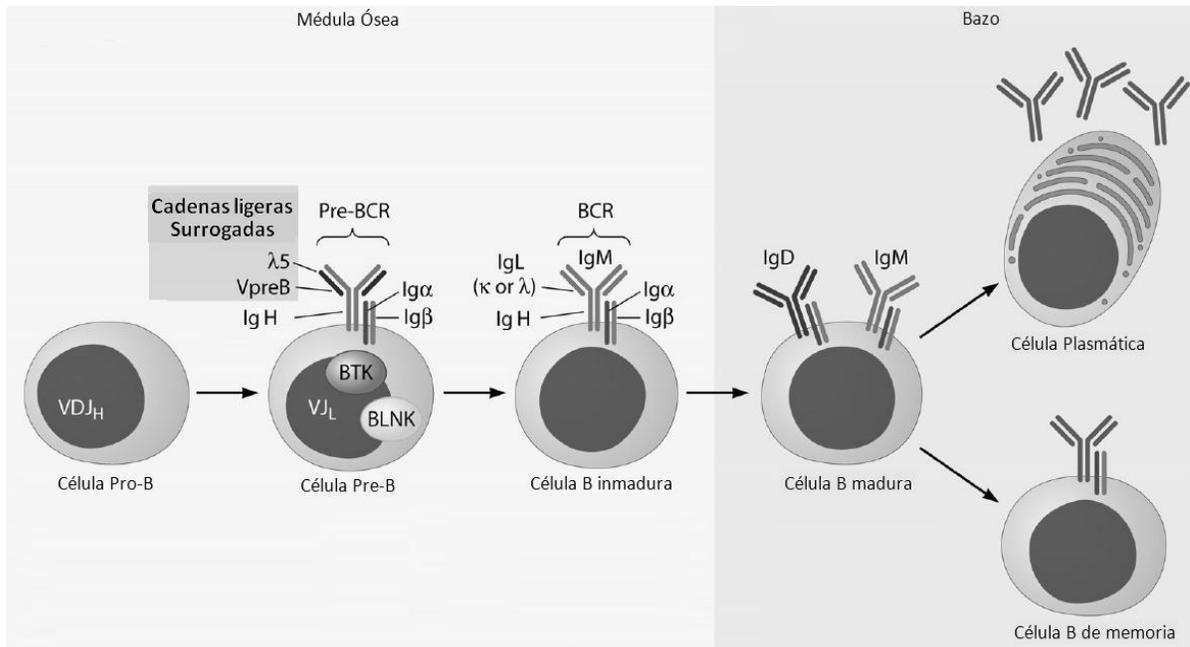


Figura 1. Desarrollo de células B. Estadios de maduración de los linfocitos B (modificado de Fried y Bonilla, 2009).

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

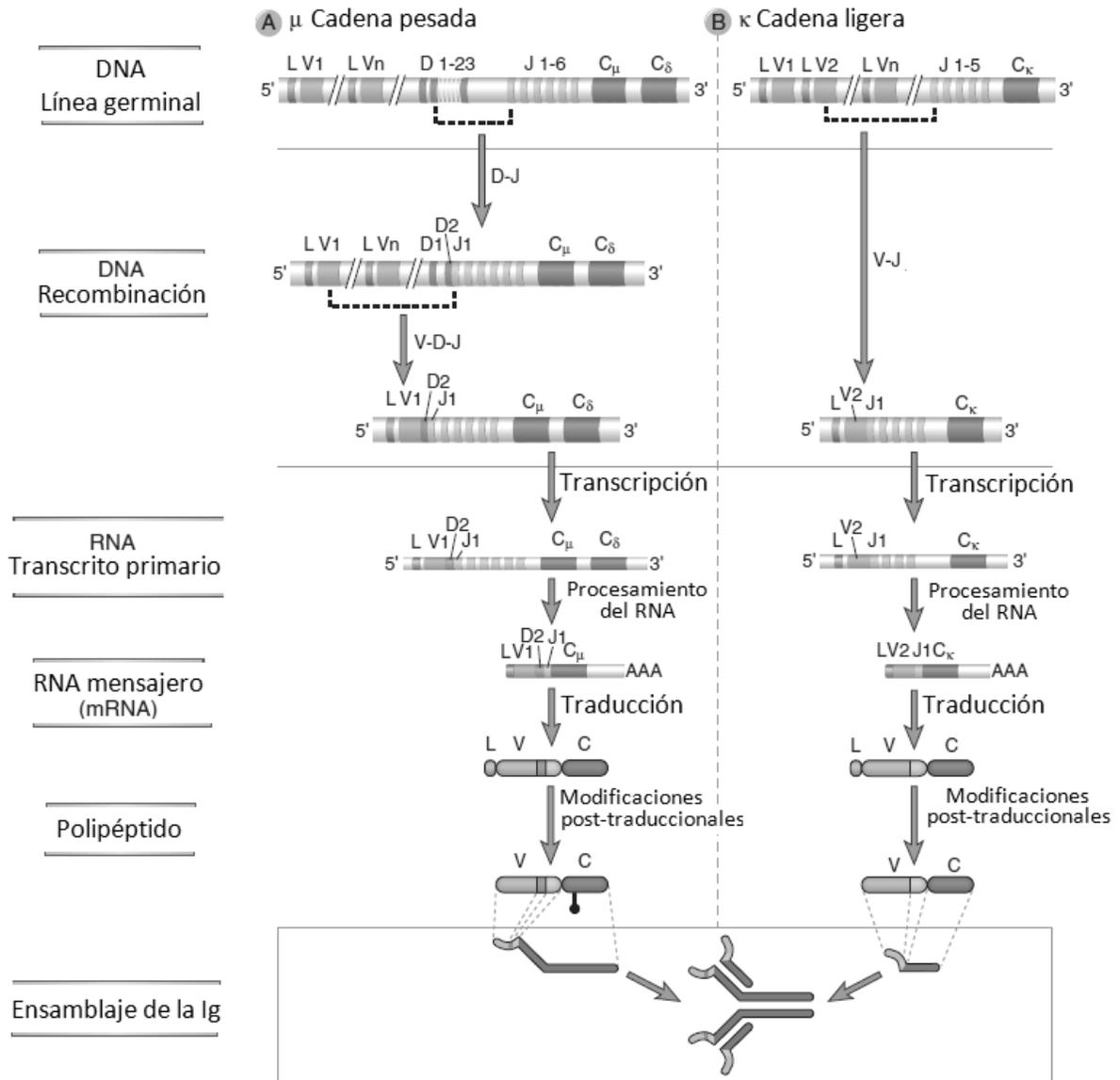


Figura 2. Recombinación de los genes que codifican la cadena IgH e IgL. Secuencia de recombinación de la IgH (A) y de la IgL (B) (modificado de Abbas y col., 2012).

La maduración del linfocito B inicia con el estadio pro-B, en el cual se lleva a cabo la recombinación de la región variable de la cadena pesada (IgH), la primera recombinación es entre los genes D_H y J_H (D_HJ_H) en ambos alelos. (Van Zelm y col., 2005). El siguiente estadio es el pre-BI donde termina la recombinación de los segmentos D_H-J_H e inicia la recombinación V_H-D_H-J_H

misma que finaliza en los linfocitos pre-BII (grandes), la región variable se une a la constante (μ) por un mecanismo de “splicing” alternativo (Kurosaki, 2002). Cuando la IgH ha sido exitosamente expresada, se asocia con las proteínas de señalización Ig α (CD79a) e Ig β (CD79b) y las cadenas ligeras surrogadas (λ 5 y Vpre-B), generando el receptor de antígeno del linfocito pre-B (pre-BCR), en este estadio se deja de expresar el complejo Rag1/Rag2.

La expresión del pre-BCR es el primer punto de control durante la maduración de las células B, donde las señales del receptor inhiben el reordenamiento de la IgH del segundo alelo, sin embargo, si la recombinación del primer alelo no es productivo se reordena el segundo alelo. En caso de que ninguna recombinación sea productiva, el linfocito se va a apoptosis (muerte celular programada). Las señales del pre-BCR y del receptor de IL-7 inducen la proliferación de los linfocitos pre-BII (grandes) seguido de la re-expresión de Rag para la recombinación de la IgL entre los genes V_L y J_L en los linfocitos pre-BII (pequeños). Al recombinarse exitosamente la cadena IgL, se une a la cadena IgH (cadena μ) más Ig α e Ig β para formar el BCR (isotipo IgM) que se expresa en la superficie celular, lo cual da origen al último estadio de maduración del linfocito B en médula ósea, linfocito B inmaduro (Herzog y col., 2009; Martensson y col., 2007; Abbas y col., 2012).

Los linfocitos B inmaduros salen a la periferia y migran a bazo para terminar su maduración convirtiéndose en linfocitos B maduros. Para diferenciar a los linfocitos B inmaduros que se encuentran en médula ósea de los que viajan hacia bazo se ha utilizado el término de linfocito B transitorio (T), estos se diferencian de los maduros por tener una vida media corta y expresar el marcador AA4 (CD93). Existen al menos tres distintos estadios de linfocitos B transitorios, los T1, T2 y los T3 (Allman y Pillai, 2008; Thomas y col., 2006; Matthias y Rolink, 2005).

Los linfocitos B maduros se pueden clasificar en linfocitos B de zona marginal o foliculares. Los de zona marginal responden de forma rápida a su antígeno y a estímulos inflamatorios, estos linfocitos juegan un papel importante dentro de la

inmunidad innata, también participan en el transporte de los antígenos a los folículos de bazo por medio de complejos inmunes, por lo que pueden estar implicados en la respuesta a antígenos T-dependiente. Los linfocitos B foliculares reconocen antígenos T-dependientes y son importantes en la respuesta inmune adaptativa, participan en la formación de los centros germinales, en los cuales se lleva a cabo la maduración de la afinidad, cambio de isotipo, generación de linfocitos B de memoria y células plasmáticas (Abbas y col., 2012).

Regulación del desarrollo de los linfocitos B

Durante la ontogenia del linfocito B se requiere de la acción concertada de múltiples factores de transcripción incluyendo Ikaros, PU.1, E2A, EBF y Pax-5 (Mayani y col., 2007). En el linaje de los linfocitos B el factor de transcripción Ikaros es altamente expresado en los CLPs, en linfocitos pro-B y pre-B, este factor puede activar o reprimir distintos genes, al reclutar complejos multiproteicos que remodelan la cromatina incrementando el acceso de otros factores de transcripción. Los genes para TDT y $\lambda 5$ se han identificado como blancos directos de Ikaros. En los CLPs Ikaros promueve la diferenciación al linaje B, ya que la falta de este factor en CLP resulta en la diferenciación de las células NK, además de ser importante en la transición de los linfocitos pro-B a pre-B (Matthias y Rolink, 2005; Ramírez y col., 2010; Zwollo, 2011).

El factor de transcripción PU.1 regula la bifurcación entre el linaje mieloide y el linfoide, ya que bajas concentraciones de este factor (PU.1^{low}) favorecen la diferenciación de los linfocitos B, mientras que niveles elevados (PU.1^{high}) promueven el desarrollo hacia el linaje mieloide (Figura 3). PU.1 es un factor de transcripción que controla la expresión de IL-7R α a través de unión directa al promotor. La unión IL-7 a su receptor promueve la diferenciación de CLP a linfocitos pro-B, además de activar el gen anti-apoptótico Mcl e inducir proliferación. PU.1 también activa la expresión de los genes E2A, EBF y PAX5 (Van Zelm y col., 2005; Matthias y Rolink, 2005).

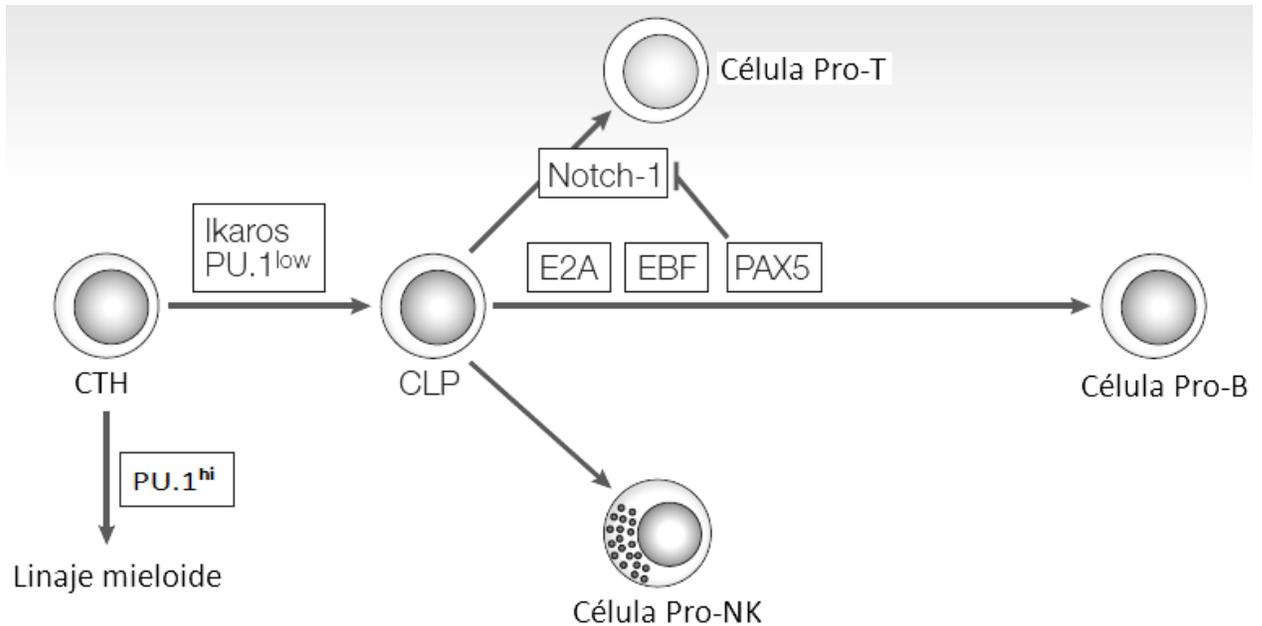


Figura 3. Regulación en la diferenciación de linfocitos B. Esquema que muestra algunos de los factores más relevantes en el control de la diferenciación (modificado de Matthias y Rolink, 2005).

Se han caracterizado 3 factores de transcripción que trabajan en colaboración durante el desarrollo de CLPs a linfocitos B inmaduros, los factores de transcripción E2A, EBF y Pax-5, la ausencia de cualquiera de estos factores bloquea el desarrollo de los linfocitos B en la etapa de pro-B o pre-B (Matthias y Rolink, 2005). Estos factores de transcripción participan en el reordenamiento de las cadenas abriendo el locus de la Ig e induciendo la expresión de los genes RAG 1 Y 2, TDT y de otras proteínas del complejo pre-BCR (Van Zelm y col., 2005).

El gen E2A vía splicing alternativo codifica para dos proteínas (E12 y E47) que regulan la expresión de los genes $\lambda 5$, TDT y EBF, además de participar en la recombinación de genes de las cadenas de las Ig's (Zwollo, 2011).

La expresión de EBF se encuentra incrementado en los CLPs, linfocitos pro-B e inmaduros y junto con E2A regula la expresión de CD79a y VpreB1, además de regular la recombinación de genes $V_H-D_H-J_H$ (Zwollo, 2011). PAX5 es blanco directo del gen EBF por lo que expresión de EBF es esencial para la expresión

de PAX5, Pax-5 ha sido implicado en la regulación de más de 100 genes específicos de los linfocitos B con diversas funciones en la regulación transcripcional, adhesión, migración y señalización. Pax-5 interviene en el incremento de la expresión de los genes EBF1, CD19, mb-1, BLNK y VPREB1, Pax-5 no solo activa genes si no que también reprime la expresión de genes que intervienen en la diferenciación de linajes diferentes a linfocitos B como el receptor de M-CSF y Notch-1 (Mandel y Grosschedl, 2010; Pérez y col., 2011), por lo que Pax-5 es importante para que la vía de diferenciación del linaje B continúe.

Mecanismos de tolerancia

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

Los mecanismos de tolerancia son determinados por la afinidad del BCR al antígeno así como por la señalización del BCR, ocurren tanto a nivel de médula ósea como en órganos linfoides secundarios (Basten y Silveira, 2010). Estos mecanismos son: edición del receptor, delección clonal y anergia. La edición del receptor ocurre cuando el BCR de los linfocitos B inmaduros reconoce antígenos propios (multivalentes) que están presentes en altas concentraciones en médula ósea, lo que inicia un nuevo reordenamiento de genes (V_k-J_k) de la cadena ligera, expresándose una nueva cadena ligera y un BCR con una nueva especificidad. Cuando la edición del receptor falla los linfocitos B auto-reactivos son sometidos a delección clonal. Si los linfocitos B inmaduros reconocen antígenos propios con baja afinidad, los linfocitos pierden su capacidad de respuesta y migran de médula ósea a bazo, donde permanecen

en un estado de no respuesta lo que se conoce como anergia (Grimaldi y col., 2005).

Solamente el 10% de los linfocitos B inmaduros salen a la periferia como linfocitos B transitorios-1 (T1), los cuales migran a bazo donde pueden encontrar otros auto-antígenos que no se encuentran en médula ósea. Así las clonas auto-reactivas que escapan de médula ósea son sometidas a mecanismos de tolerancia periférica (Basten y Silveira, 2010). El primer punto de control ocurre en los linfocitos B transitorios, en la transición de T1 a T2, en el cual se evita que clonas auto-reactivas continúen el proceso de maduración mediante los mecanismos de delección clonal y/o anergia (Pillai y col., 2011). Todos aquellos linfocitos T1 en los que el BCR interactúe con alta afinidad con el antígeno, son eliminados por delección clonal. Mientras que todos aquellos que interactúen con baja afinidad permanecerán en anergia (Basten y Silveira, 2010) (Figura 4).

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

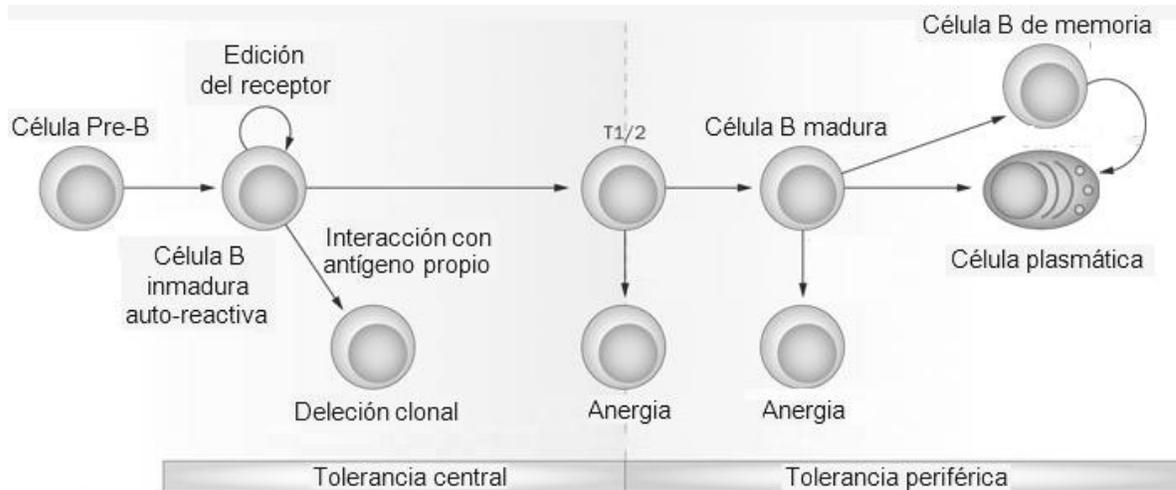


Figura 4. Mecanismos de tolerancia en linfocitos B. Diagrama que muestra los puntos de control para eliminar a las células auto-reactivas (modificado de Kirk y col., 2010).

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmune caracterizada por la producción de auto-anticuerpos, dirigidos contra diversas moléculas del núcleo como el DNA, RNP, Ro, La, histonas, etc., los cuales pueden formar complejos inmunes que con frecuencia salen de circulación y se depositan en el riñón, piel, cerebro, entre otros tejidos causando inflamación y daño tisular (Lipsky, 2001; Grammer y Lipsky, 2003).

Se han empleado varios modelos de ratón para entender los aspectos relevantes de la patogenia de LES. Las cepas NZBxNZW F1, BXSB, MRL y MRL-FAS^{lpr} (MRL/lpr), desarrollan espontáneamente una enfermedad semejante a lupus en humanos (Andrews y col., 1978; Furukawa y Yoshimasu, 2005; Pathak y Mohan, 2011). La cepa MRL/lpr tiene una mutación en la molécula FAS y se caracteriza por presentar glomerulonefritis, depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia y producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente dirigidos contra DNA de doble cadena (dsDNA). Estas manifestaciones de la enfermedad comienzan a aparecer a las 12 semanas de edad, la vida media de esta cepa es de 25 semanas. Mientras que la cepa MRL no presenta la mutación FAS y la

enfermedad aparece más tardíamente y es menos agresiva (Watanabe y col., 1992; Adachi y col., 1996; Pathak y Mohan, 2011; Grimaldi y col., 2005). Se desconoce la etiología de LES. Sin embargo, se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos, tienen una estrecha interacción para que se desarrolle autoinmunidad y se exprese clínicamente la enfermedad (Grammer y Lipsky, 2003; Petri, 2008; Grimaldi y col., 2005). LES afecta predominantemente a mujeres con una relación mujer:hombre de 10:1, en edad reproductiva, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunostimuladoras de las hormonas sexuales como el estrógeno y la prolactina (PRL). LES tiene una tendencia a presentarse o bien a exacerbarse durante el embarazo cuando se encuentran elevados los niveles séricos de PRL. Los niveles séricos elevados de PRL se han asociado con la actividad de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Leañós y col., 2001).

Prolactina

La PRL es una hormona proteica de 23 kDa, debido a su homología estructural y la similitud en sus propiedades biológicas, pertenece a la familia de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario (Figura 5). Existen diferentes isoformas de la PRL, la principal presente en hipófisis y suero tiene un peso molecular de 23 kDa (Bole-Feysot y col., 1998), otras isoformas son la glicosilada (25 kDa) con menor actividad biológica, una pequeña de 16 kDa implicada en el proceso de angiogénesis (Piwnica y col., 2006), la macroprolactina que puede estar constituida por dímeros y/o polímeros de la misma hormona o por la unión con otras proteínas como los anticuerpos (150 kDa) (Bole -Feysot y col., 1998; Leañós y col., 2001). Estas isoformas resultan de distintos mecanismos como: splicing alternativo, ruptura proteolítica y modificaciones post-traduccionales (dimerización, polimerización, fosforilación, glicosilación, sulfonación) (Freeman y col., 2000).

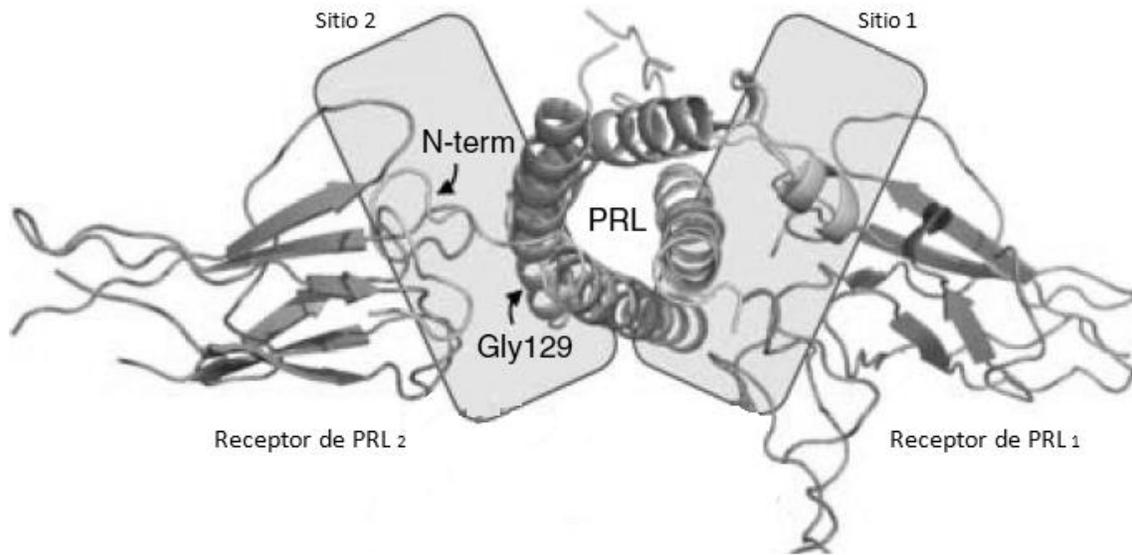


Figura 5. Estructura tridimensional del complejo PRL - receptor de PRL. La PRL es una proteína globular formada por 4 α -hélices, 3 puentes disulfuro y tiene dos sitios de unión con su receptor (modificada de Bernichtein y col., 2010).

Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales se pueden clasificar en cinco categorías: 1) reproducción, 2) metabolismo de lípidos y carbohidratos, 3) osmoregulación, 4) inmunoregulación y 5) crecimiento y desarrollo. Es sintetizada y secretada por la hipófisis anterior y de forma extra-hipofisaria por múltiples tejidos como: endometrio, células epiteliales mamarias, linfocitos T y B, tejido adiposo, piel entre otros. El gen de la PRL está compuesto de 5 exones separados por 4 intrones con una longitud de 10 kb, en ratones el gen se localiza en el cromosoma 13 mientras que para el humano se localiza en el cromosoma 6. El gen de la PRL consta de 2 promotores, el promotor proximal que consta de 13 sitios de unión a Pit-1 (factor de transcripción específico de hipófisis) y el promotor superdistal (único en humanos) gracias al cual se lleva a cabo la transcripción en sitios extra-hipofisarios independientemente de Pit-1 (Figura 6). Como todas las proteínas secretoras, el gen de la prolactina codifica una pro-hormona con un péptido señal con un N-terminal de 29 residuos que posterior a la escisión proteolítica

del péptido señal da lugar a una proteína madura compuesta de 199 residuos en humanos y 197 residuos en roedores (Ben-Jonathan y col., 2008).

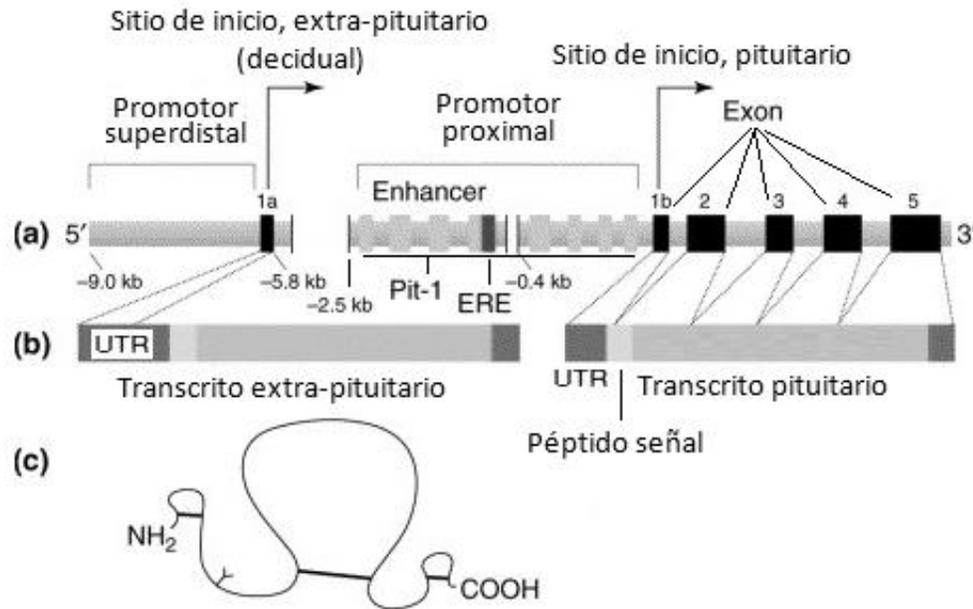


Figura 6. Gen de la PRL. a) Región promotora proximal y superdistal del gen de la PRL humana, b) Transcrito hipofisario y extra-hipofisario, c) Localización de los 3 puentes disulfuro en la PRL (modificado de Ben-Jonathan y col., 2002).

Receptor de prolactina

El receptor de PRL es una proteína transmembranal; al igual que la PRL se encuentra distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B. Pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase I, dentro de la que se encuentran el receptor de la eritropoyetina, la interleucina 2 (IL-2), entre otros. Está constituido por tres regiones: extracelular, transmembranal e intracitoplasmática. Existen diferentes isoformas del receptor, en el ratón se conocen 4 isoformas, una larga y tres cortas, mientras que en el humano existen cinco isoformas (larga, intermedia, dos cortas y la soluble) las diferentes isoformas del receptor son idénticas en el dominio extracelular, pero difieren en longitud y composición de aminoácidos en la región intracitoplasmática (Ben-Jonathan y col., 2008). La región extracelular está constituida por

aproximadamente 200 aminoácidos, presenta dos puentes disulfuro e interacciona con la PRL, la región transmembranal posee 24 aminoácidos y la citoplasmica presenta un dominio con motif de triptófano y serina (WS) y dos regiones conservadas (caja1 y caja 2) (Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000).

A través de la isoforma larga del receptor de PRL, la PRL activa varias vías de señalización intracelular, incluyendo Jak2/Stat, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Estos eventos de señalización inducen la expresión de varios genes implicados en la proliferación celular y diferenciación, mientras que la PRL a través de la isoforma corta del receptor solo puede activar las vías MAPK y PI3K (Binart y col., 2010; Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000) (Figura 7).

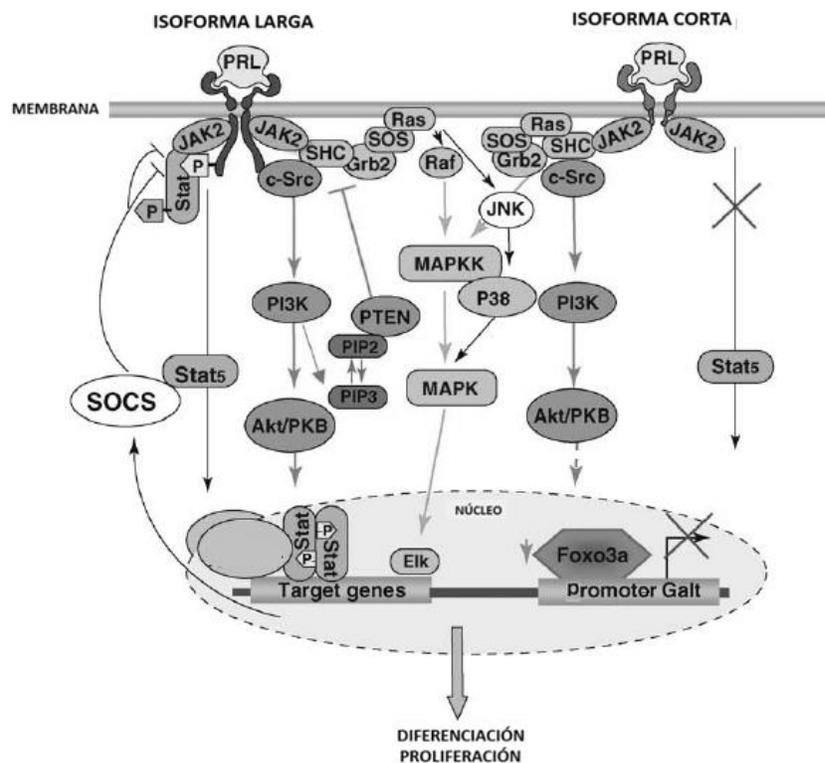


Figura 7. Principales vías de señalización desencadenadas por isoformas larga y corta del receptor de PRL. La vía Jak/Stat involucra a la tirosina cinasa Jak2 y los miembros de la familia Stat (Stat 1, 3, 5a y 5b). Otra vía importante es la vía MAPK que consta de los intermediarios Grb2/Sos/Ras/Raf. La producción de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol disfosfato (PIP2) por PI3K conduce a la activación de Akt, como regulador negativo de esta vía se encuentra la fosfatasa PTEN que convierte PIP3 a PIP2 (modificado de Binart y col., 2010).

- **Vía de señalización Jak/Stat:** La región intracelular próxima a la membrana (caja 1) del receptor de PRL en su forma inactiva (monómero) se encuentra constitutivamente asociado a Jak2 (Jak es una familia de proteínas tirosina cinasa que incluye Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2). La interacción de la PRL con su receptor induce la dimerización del mismo activando (por fosforilación) a Jak2, posteriormente Jak2 fosforila a Stat (Stat1, Stat3, Stat5a y Stat5b). Al encontrarse fosforilado Stat se disocia del receptor formando un homo o heterodímero que se transloca al núcleo donde se une al promotor y activa la transcripción de genes (Clevenger y col., 2009).
- **Vía de señalización MAPK:** Diferentes señales pueden activar la vía de las MAP cinasas; la interacción de la PRL con su receptor recluta a la proteína Shc a través de los residuos tirosina fosforilados por Jak2 en su región citoplasmática, Shc a su vez recluta a la proteína adaptadora Grb2 a la cual se une la proteína Sos, la cual cataliza el intercambio GDP-GTP de la proteína Ras, Ras-GTP activa a Raf-1 que a su vez fosforila a MEK, MEK fosforila a ERK y finalmente ERK fosforila a Elk-1, de esta forma se incrementa la expresión de c-Fos (componente del factor de transcripción AP-1). En la vía JNK la proteína TRAF2 unida a TRADD de la vía TNF activa a la proteína MEKK1, MKK4 es fosforilada por MEKK1, JNK es fosforilada por MKK4 y esta fosforila a c-Jun. La vía MAPK es importante en la diferenciación y proliferación celular (Tripathi y Sodhi, 2008; Pearson y col., 2001).
- **Vía de señalización NFκB:** Vía de señalización activada principalmente por receptores tipo toll (TLR) y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Las diferentes vías de activación de NFκB convergen en la activación del complejo IKK (NEMO, IKKβ e IKKα), el cual fosforila a IκB (inhibidor de NFκB) dando como resultado su ubiquitinación y degradación en proteosoma, dejando libre a NFκB para su translocación a núcleo (Meads y col., 2010). La unión de TLR a su ligando recluta

proteínas adaptadoras como MyD88 a su región citoplasmática, las cuales interaccionan con las proteínas IRAK 1 y 4. IRAK4 activado fosforila a IRAK 1 que a su vez activa a TRAF6, TRAF6 en asociación con otras proteínas activan el complejo IKK (Watters y col., 2007). Mientras que la unión de TNF α -TNFR1 recluta a la proteína TRADD y este a su vez recluta a TRAF2 y RIP-1 activando al complejo IKK (Zhu y col., 2010). Por último la cinasa Akt de la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt activada por la unión de PRL con su receptor, fosforila directamente IKK α de esta forma activando complejo IKK (Martelli y col., 2006).

Sistema inmune y PRL

La relación entre PRL y el sistema inmune se hizo evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (Smith, 1930). Posteriormente en 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina (agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de PRL). Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL a través de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α que actúan como reguladores parácrinos o endócrinos en la liberación o inhibición de PRL hipofisiaria (De Laurentiis y col., 2002).

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 y col., 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 y col., 1987).

Los timocitos y células mononucleadas son capaces de sintetizar PRL (Chávez-Rueda y col., 2005; Horiguchi y col., 2004). La estimulación in vitro con PRL regula el proceso de maduración (ontogenia) de timocitos dobles negativos

(CD4-CD8-) a dobles positivos (CD4+CD8+) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2 (Carreno y col., 2005). 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 y col., 2005 A) y la secreción de IL-2 e IFN- γ (Chávez-Rueda y col., 2005 B).

En linfocitos pro-B de ratón (B220+CD43+) transfectados con el receptor de PRL, la PRL aumenta la diferenciación hacia linfocitos pre-B (B220+CD43-) (Morales y col., 1999). La PRL aumenta la expresión de moléculas que participan en la maduración y diferenciación de linfocitos B como CD40 y BAFF-R, lo cual contribuye a la pérdida de tolerancia. También se ha encontrado que la PRL incrementa la formación de anticuerpos, e inhibe la apoptosis en linfocitos (Saha y col., 2011). Se ha reportado que en bazo de ratones BALB/c con hiperprolactinemia el porcentaje de linfocitos B T1 se modifica (Venkatesh y col., 2006) e incrementa la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, sugiriendo que la PRL podría estar salvando las clonas auto-reactivas en bazo (Saha y col., 2009). En ratones con trasplante de médula ósea, la administración de PRL recombinante induce un incremento en la linfopoyesis (Sun y col., 2003). En ratones “knock out” para PRL y su receptor, no se encuentran defectos en la producción de los linfocitos a pesar de que el número absoluto de los linfocitos B y sus precursores estén ligeramente disminuidos (Bouchard y col., 1999; Horseman y col., 1997). Estos resultados muestran que la PRL participa en el proceso de linfopoyesis. Sin embargo, su ausencia no es crítica y su participación en este proceso puede ser sustituida por otros factores redundantes.

Prolactina y LES

En humanos niveles séricos menores de 20ng/mL de PRL se consideran valores normales. Por arriba de esta concentración se considera un estado de hiperprolactinemia, el cual puede ser causado por diversas condiciones: fisiológicas (embarazo y lactancia), por fármacos (metoclopramida) y por

enfermedad (prolactinomas o insuficiencia renal crónica) (Bolyakov y Paduch, 2011). En enfermedades autoinmunes se han reportado niveles séricos elevados de PRL (Orbach y Shoenfeld, 2006). En pacientes con LES se han descrito concentraciones séricas altas de PRL que correlacionan con la actividad de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Leañós y col., 2001; Pacilio y col., 2001).

En la cepa de ratón NZB/NZW que desarrolla una enfermedad semejante a lupus en humanos (McMurray, 2001), se ha reportado que la hiperprolactinemia exacerba la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana al presentar un incremento de proteinuria y secreción de anticuerpos IgG principalmente, dirigidos contra DNA. En contraste, la inhibición de la secreción de PRL con bromocriptina incrementa la supervivencia en estos ratones (McMurray y col., 1991; McMurray, 2001). En ratones MRL/lpr y MRL la inducción de hiperprolactinemia con metoclopramida también exacerba la enfermedad (Ledesma y col., 2012). En ratones BALB/c R4A- γ 2b (transgénicos para un anticuerpo patogénico dirigido contra dsDNA) que no desarrollan lupus ni presentan linfocitos B auto-reactivos, al ser tratados con PRL para inducir un estado de hiperprolactinemia se observó un incremento en el número de células B auto-reactivas, en el título de anticuerpos anti-DNA y depósitos de complejos inmunes en glomérulo (Peeva y col., 2003; Saha y col., 2011).

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

Actualmente se sabe que la PRL interviene en la respuesta inmune y en procesos de diferenciación celular. Además, concentraciones elevadas de PRL exacerbaban las manifestaciones de lupus en ratones MRL/lpr, los cuales presentan fallas en los mecanismos de tolerancia por lo que resulta interesante investigar si la PRL es capaz de inducir o reprimir la expresión de genes relacionados con la maduración de los linfocitos B.

JUSTIFICACIÓN

Durante la ontogenia del linfocito B en médula ósea se requieren diferentes señales y factores de transcripción (PU.1, E2A, EBF, Pax5, etc.) que en conjunto reclutan proteínas que activan genes del linaje B o reprimen genes asociados a otros linajes. Durante la maduración de los linfocitos B, las clonas auto-reactivas son eliminadas a través de los mecanismos de tolerancia. En las enfermedades autoinmunes como en LES las clonas auto-reactivas evaden estos mecanismos llegando a madurar y producir auto-anticuerpos. En ratones que desarrollan una enfermedad semejante a lupus (MRL/lpr, NZB/NZBW) se ha reportado que el incremento en los niveles séricos de PRL exacerba las manifestaciones de la enfermedad, entre ellas la producción de auto-anticuerpos. Además, se ha reportado que la PRL puede afectar los mecanismos de delección clonal y anergia en bazo al incrementar la expresión de genes anti-apoptóticos en linfocitos B transitorios 1. Por lo que resulta interesante investigar qué genes involucrados en la maduración del linfocito B en médula ósea se ven afectados por la PRL en ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico.

HIPÓTESIS

La PRL regula la expresión de genes involucrados en la maduración del linfocito B en médula ósea de ratones MRL/lpr que desarrollan una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los genes regulados por la PRL en linfocitos B de médula ósea, de ratones MRL/lpr que desarrollan una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea de ratones MRL/lpr.
- Determinar mediante microarreglos los genes inducidos y reprimidos por la PRL, en linfocitos B de médula ósea de ratones MRL/lpr.
- Seleccionar los genes relacionados con la maduración de linfocitos B en médula ósea que fueron modificados por la PRL.
- Comprobar por RT-PCR tiempo real la expresión de 2 genes seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra de 9 semanas de edad, de la cepa C57BL/6 como control (Harlan, Indianapolis, USA) y de 2 cepas que espontáneamente desarrollan una enfermedad semejante a LES: MRL/MpJ (MRL) y MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL/lpr) provenientes de Jackson Laboratory (Maine, USA). Se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, en cajas de policarbonato de piso sólido con micro aislador, con fotoperiodos de 12 horas de luz por día y temperatura del cuarto de 22-23°C. Se les proporcionó alimento (18% de proteína cruda, 6% de grasa cruda y no más de 3% de minerales) y agua estéril a libre acceso, así como los cuidados y la atención veterinaria especificada en la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999”, la Ley General de Salud y las disposiciones del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" donde se alojaron a los animales.

Nivel de bioseguridad

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

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti B220-PE (clona RA3-6B2), anti CD23-PE (clona B3B4) de eBioscience (California, USA), y el anticuerpo conjugado a perlas magnéticas anti-B220 (clona RA3-6B2, Miltenyi Biotec, California, USA).

Hormona (Prolactina)

Se utilizó prolactina recombinante de ratón (National Hormone & Peptide Program, NIH, California, USA).

Obtención de células de médula ósea

Ratones de 9 semanas de edad de las diferentes cepas: C57BL/6, MRL y MRL/lpr fueron sacrificados por dislocación cervical, la médula ósea se obtuvo del fémur y tibia. Se cortaron los extremos de los huesos y se inyectó medio RPMI frío (Thermo Scientific, Utah, USA) suplementado con BSA (MP Biomedicals, Ohio, USA) al 0.5% y EDTA (IBI Scientific, Iowa, USA) 2mM. Se hizo un pool con la médula de 5 ratones por cada experimento y cepa, la médula se disgregó y pasó por un colador de nylon 70µm (BD Biosciences, New Jersey, USA), se centrifugó (900 rpm/10 min), decantó y lisaron los eritrocitos con 2mL de regulador de lisis (Sigma Aldrich, Missouri, USA), las células se lavaron con medio RPMI y se contaron con azul tripan (BioWhittaker, Maryland, USA) en la cámara de Neubauer.

Purificación de linfocitos B de médula ósea

La purificación de linfocitos B se realizó por selección positiva a partir de células de médula ósea. Las células se incubaron por 15 minutos a 4°C con anticuerpo anti-B220 conjugados a perlas magnéticas, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, California, USA). A las células B220⁺ se les eliminó la marca magnética siguiendo las especificaciones del kit anti-PE Multisort (Miltenyi Biotec, California, USA), las células fueron teñidas con anticuerpo anti CD23-PE, e incubadas con las perlas anti-PE del kit anti-PE Multisort se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS.

Citometría de flujo

Las células se incubaron a 4°C por 20 minutos con 1µL del anticuerpo anti B220-PE o sin anticuerpo (blanco) posterior a la selección positiva, se lavaron con regulador FACS y fijaron con paraformaldehído (2%). Estas células y una muestra de las células recuperadas por selección negativa se leyeron en el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) para verificar la pureza.

Cultivo celular

Los linfocitos B fueron incubados en medio AIMV (Invitrogen, California USA) y se estimularon en las siguientes condiciones: a) medio AIMV (control), b) PRL (50ng/mL), a 37°C durante 1, 2 y 4hrs. Se utiliza una concentración de 50ng/mL de PRL con el fin de establecer un estado de hiperprolactinemia y la cinética corresponde al tiempo en que la PRL ejerce su efecto (la primera hora después de la activación de los linfocitos) (Chávez-Rueda y col., 2005 B).

Extracción de RNA

Los linfocitos B se re-suspendieron en 1mL de Trizol (Invitrogen, California USA), se les adicionó 10µL de glicógeno por cada mL de Trizol, se adicionó 200µL de cloroformo (Sigma Aldrich, Missouri, USA), se homogeneizó y centrifugó a 12000rpm/15 min. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se le adicionaron 550µL de isopropanol (J.T Baker, USA), se precipitó toda la noche a 70°C. Se centrifugó y eliminó el isopropanol, el botón se lavó con 1mL etanol (Sigma Aldrich, USA) al 75%. El RNA se re-suspendió en 15µL de agua inyectable.

Cuantificación del RNA

Se cuantificó y evaluó la pureza utilizando el espectrofotómetro GeneQuant Pro. Para ello se preparó una dilución de 1:50 del RNA obtenido, fueron registrados los valores de absorbancia a 260nm y 280nm, se calculó la concentración de RNA ($Abs_{260} * FD * 40 = \mu g \text{ RNA/mL}$) y la pureza del RNA ($Abs_{260}/280$).

Microarreglos.

La tecnología de microarreglos permite el análisis de diversos genes, proporcionando datos cuantitativos y reproducibles. Consta de un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (panel), la muestra a analizar es marcada con un fluorocromo y es incubada en el panel permitiendo la hibridación de secuencias homólogas, posteriormente el escáner y las herramientas informáticas nos permiten interpretar y analizar los datos

obtenidos. Su principal ventaja respecto a otras técnicas de análisis de expresión génica (Northern blot, protección de RNAsa, PCR-tiempo real) es su capacidad de analizar simultáneamente un gran número de genes, en cuanto a sus limitaciones se considera su costo relativamente alto, baja precisión, además de que esta técnica debe ser verificada mediante otras plataformas. Para determinar los genes regulados por la PRL en los linfocitos B se utilizó la técnica de microarreglos, utilizando la cepa MRL/lpr que desarrolla LES en menor tiempo y con más agresividad. 30µg/µL de RNA de la cepa MRL/lpr se utilizó para realizar un análisis de expresión mediante la técnica de microarreglos, el estudio se realizó en la Unidad de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando el microarreglo de Ratón 22K, con las siguientes características.

Número de genes	22,000 (70% del genoma)
Fuente de información	NCBI/GenBank
Tamaño de sondas	65 mer
Número de aplicaciones por gen	2
Número total de aplicaciones	44000
Área del microarreglo	18 X 54
Distancia entre aplicaciones	140 µm

Análisis estadístico de los microarreglos

Se realizó un análisis *in silico* de los resultados obtenidos utilizando el programa GenArise, dentro de este análisis se contempló la corrección del fondo de la técnica, el ajuste en el radio y en las medidas de las intensidades (normalización y filtrado de la intensidad). La selección diferencial en la expresión de genes fue identificado calculando el valor z, se seleccionaron aquellos genes con valores por debajo o por arriba de 2, este valor fue

establecido por el Instituto de Fisiología Celular e indica una diferencia estadísticamente significativa (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

Identificación de los genes expresados

Se realizó un análisis *in silico* de los genes expresados, estadísticamente significativos, utilizando la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEGG, del inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y un análisis funcional *in silico* utilizando la base de datos de bioinformática DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

Síntesis de cDNA

El cDNA se preparó a partir de 0.5µg de RNA, 1µL de oligo-(dT)₁₆ (Invitrogen, California USA) y se llevo a un volumen final de 11µL con agua inyectable, la reacción se incubó a 65°C por 5 minutos, se adicionó 7µL de una mezcla de reacción (4µL de regulador 5X, 2µL de DTT 0.1M y 1µL de dNTP a 10mM, Invitrogen, USA), 1µL dNTPs (Invitrogen, California USA) 10mM y 1µL de la enzima reverso Superscript III (Invitrogen, California USA); la mezcla se incubó 1 hora a 50°C y 15 minutos a 70°C. El cDNA obtenido se almacenó a -40°C.

RT-PCR tiempo real

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, es una técnica de análisis de expresión de genes que permite detectar y cuantificar mRNA, esta técnica amplifica fragmentos de DNA (cDNA obtenido de la muestra de mRNA) mediante una DNA polimerasa que añade desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a la cadena molde, la hidrólisis de la sonda gracias a la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa permite a la molécula fluorescente de la sonda emitir una señal que será cuantificada. Es una técnica muy sensible (detecta cantidades muy limitadas), eficaz, sencilla y rápida, se deben tomar en cuenta los errores cometidos por la DNA polimerasa como una desventaja de la técnica (Ozkan y Heller, 2006). Esta técnica se utilizó para comprobar los resultados obtenidos en los microarreglos.

El RT-PCR tiempo real para los distintos genes (Birc5, Ikzf1, receptor de PRL y β -actina como gen constitutivo) se realizó empleando el kit LightCycler TaqMan Master (Roche, Alemania). Se realizó la mezcla de reacción con: 1 μ L de la mezcla sonda/iniciadores, 2 μ L de Master Mix (Roche, Alemania), 4.5 μ L de agua inyectable y 2.5 μ L de muestra. Las muestras se procesaron en el termociclador LightCycler II (Roche), mediante el siguiente programa:

A) β -actina y receptor de PRL

Condiciones	No. De Ciclos
95°C x 15 minutos	1
95°C x 10 segundos 61°C x 30 segundos 72°C x 01 segundos	40
50°C x 30 segundos	1

B) Ikzf1

Condiciones	No. De Ciclos
95°C x 15 minutos	1
95°C x 10 segundos 60°C x 30 segundos 72°C x 01 segundos	40
50°C x 30 segundos	1

C) Birc5

Condiciones	No. De Ciclos
40°C x 10 minutos	1*
95°C x 15 minutos	1
95°C x 10 segundos 60°C x 30 segundos 72°C x 01 segundos	40
50°C x 30 segundos	1

*UDG

Los “primers” utilizados fueron:

β-actina (sonda No.56)	Sentido	GTGGTACGACCAGAGGCATAC
	Anti-sentido	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT
Receptor de PRL (sonda No.38)	Sentido	GAGGAGGCTCTGGTTCAACA
	Anti-sentido	CAGTAAATGCCACGAACGAA
Ikzf1 (sonda No.29)	Sentido	TGCCACAACACTTGGAAAGC
	Anti-sentido	CTCTCTGCTCCTATCTTGACACA
Birc5 (sonda No. 71)	Sentido	CCCGATGACAACCCGATA
	Anti-sentido	CATCTGCTTCTTGACAGTGAGG

El cálculo de la expresión relativa de los genes se realizó mediante el siguiente algoritmo:

$$\Delta\Delta CT$$

$$\Delta CT1 (\text{muestra control}) = C_p (\text{Ikzf1, Birc5 o receptor de PRL}) - C_p (\beta\text{-actina})$$

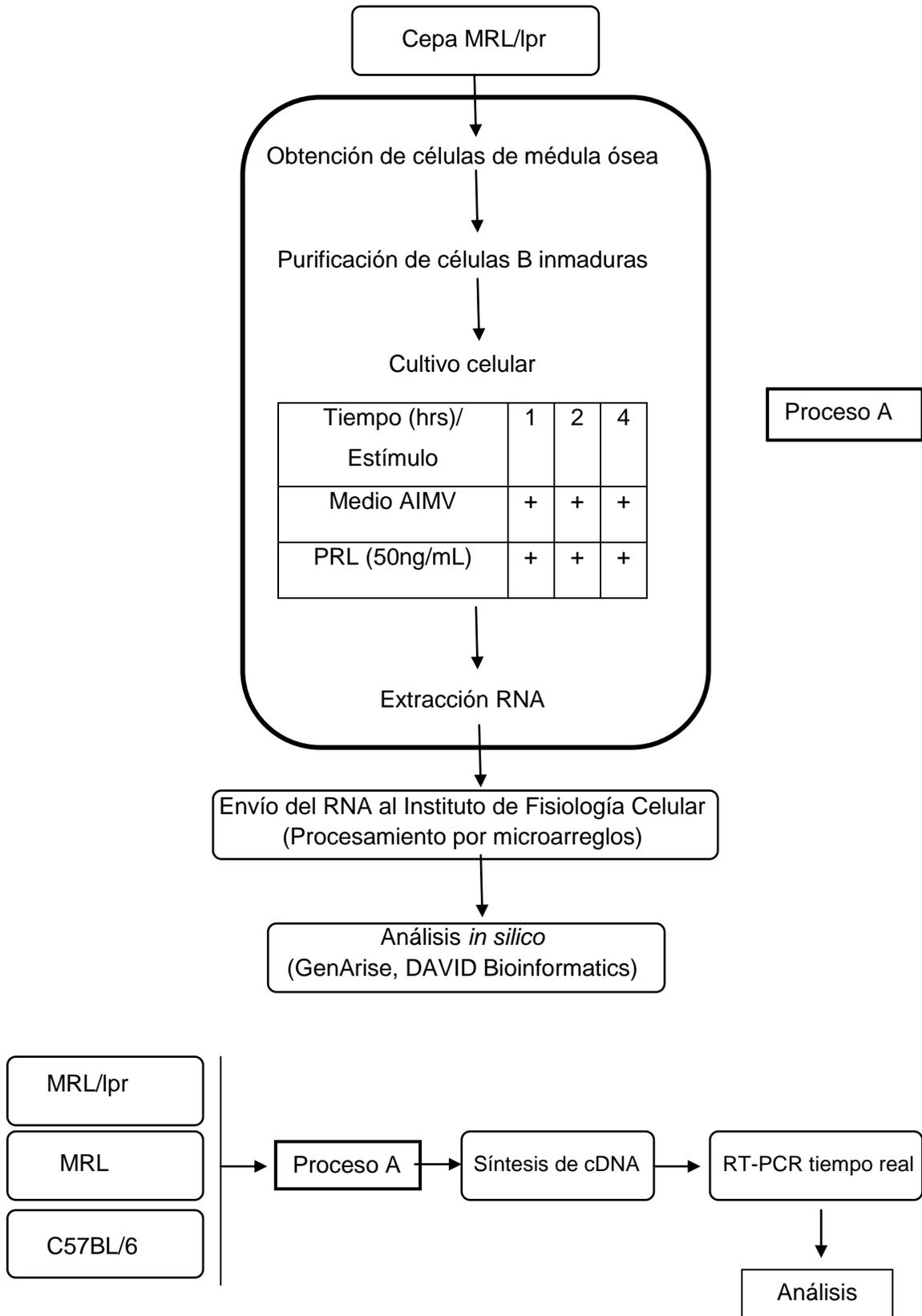
$$\Delta\Delta = \Delta \text{ problema} - \Delta CT1$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta}$$

Análisis estadístico.

Los datos tuvieron una distribución normal y se describen en promedio y desviación estándar. La comparación entre 2 grupos se realizó mediante la prueba de “t de Student” y 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 utilizando el programa de computo SPSS 15.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Purificación de linfocitos B

La purificación de los linfocitos B se realizó a partir de células de médula ósea de la cepa MRL/lpr por selección positiva, obteniendo purezas mayores al 95% verificado por citometría de flujo (Figura 8A). Estos linfocitos se sometieron a una segunda purificación por selección negativa para eliminar a los linfocitos B maduros (CD23+) (Figura 8B), obteniendo a los linfocitos B inmaduros con purezas mayores del 95%, los cuales están constituidos por los diferentes estadios de maduración de los linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros).

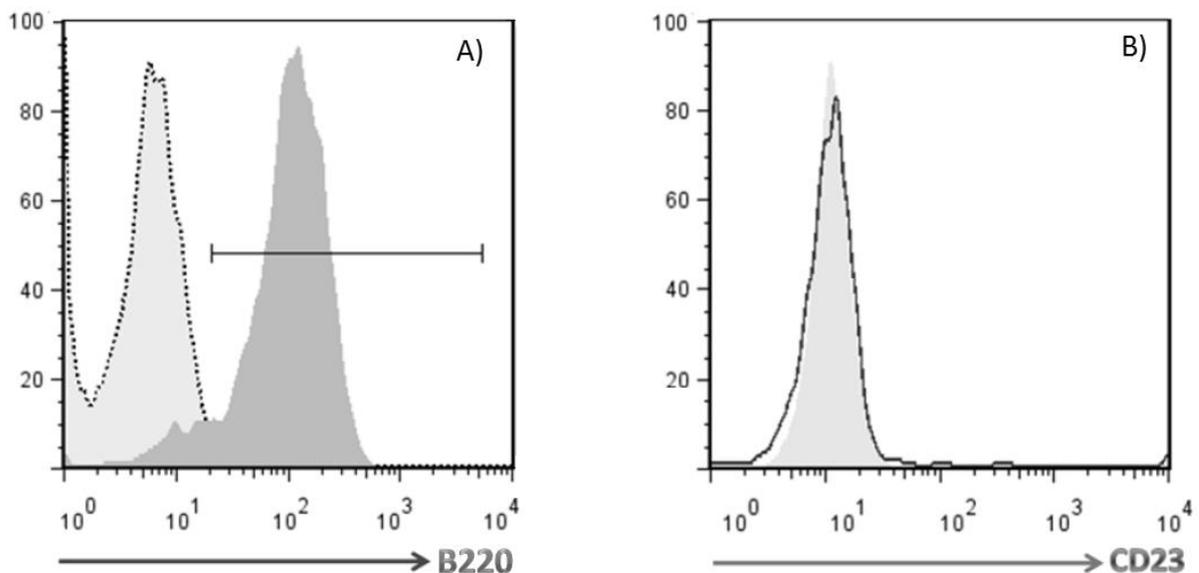


Figura 8. Purificación de linfocitos B inmaduros. A) Células de médula ósea fueron marcadas con un anticuerpo anti-B220 unido a perlas magnéticas y purificadas por selección positiva utilizando columnas LS, la pureza se verificó por citometría de flujo con el anticuerpo anti B220-PE. B) Los linfocitos B fueron tratados con el kit anti-PE Multisort para eliminar las perlas magnéticas y poder marcar las células con el anticuerpo anti CD23-PE y por selección negativa se eliminaron a los linfocitos B maduros (CD23+).

Expresión del receptor de PRL

La expresión del receptor de PRL a nivel de mRNA fue determinada por RT-PCR tiempo real, empleando “primers” para la porción extracelular del receptor, como gen constitutivo se utilizó β -actina. Encontramos su expresión, como se puede apreciar en la figura 9 donde se muestra la curva de amplificación del receptor de PRL y β -actina de los linfocitos B inmaduros.

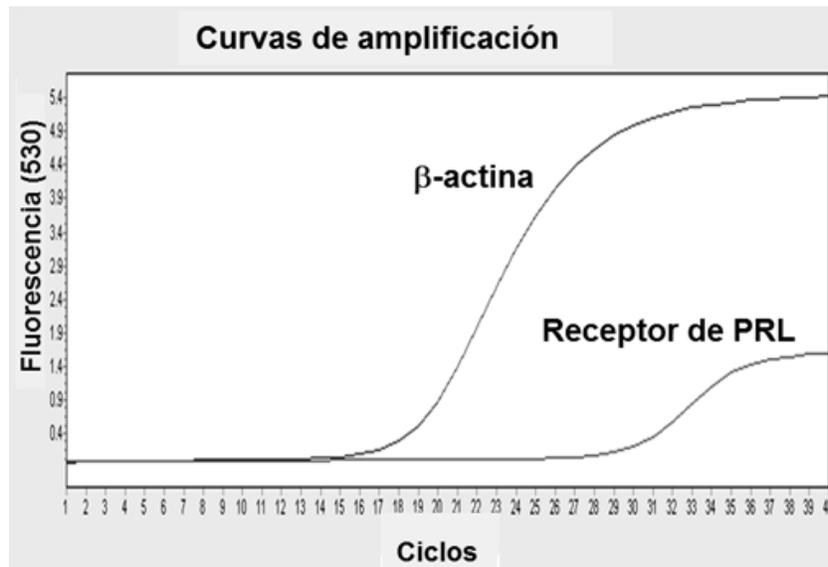


Figura 9. Expresión del receptor de PRL. Mediante RT-PCR tiempo real se determinó la expresión del receptor de PRL en linfocitos B inmaduros de médula ósea de la cepa MRL/lpr, se utilizó β -actina como gen constitutivo.

Genes modulados por prolactina

En el diseño experimental seleccionado para la elaboración del análisis de expresión de los genes, se normalizó la expresión de genes de las células incubadas con PRL contra el control (células incubadas con medio).

Los genes modulados por la PRL en los linfocitos B inmaduros aislados de la cepa MRL/lpr, fueron determinados a través de la técnica de microarreglos. Se realizaron 3 ensayos a diferentes tiempos de incubación. Se encontró que 582

genes fueron inducidos significativamente (valor de $z > 2$) por la PRL a la hora de estímulo y 335 genes fueron reprimidos. A las 2hrs de incubación, 630 genes fueron inducidos y 277 fueron reprimidos. Mientras que con una estimulación de 4hrs, se encontró que 660 genes fueron inducidos y 328 fueron reprimidos (Figura 10).

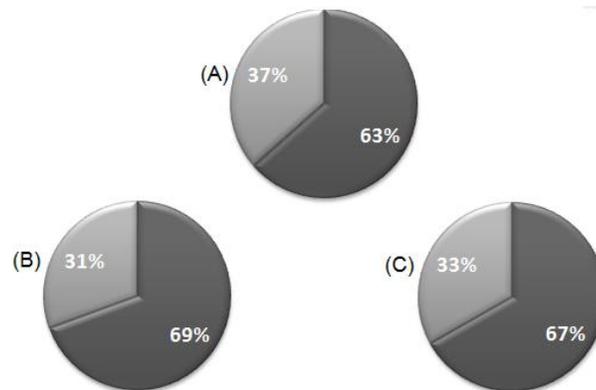


Figura 10. Genes modulados por la prolactina. Utilizando microarreglos de DNA para ratón constituido por 22,000 oligos (70% del genoma) se determinaron los genes modulados por la PRL (50ng/mL). A) Genes inducidos (63%) y reprimidos (37%) por la PRL a la hora de incubación, B) Genes inducidos (69%) y reprimidos (31%) a las 2hrs de incubación, C) genes inducidos (67%) y reprimidos (33%) a las 4hrs de incubación.

Selección de genes

Del 70% del genoma analizado, se seleccionaron los genes en base a 2 criterios. El primer criterio fue elegir a todos aquellos genes cuya expresión o represión fuera estadísticamente significativa teniendo un valor de Z de ± 2 , siendo el valor Z la desviación en base a la media de expresión de los genes. El segundo criterio consistió en la selección de genes importantes y reportados que están asociados a la maduración de los linfocitos B en medula ósea (Pathak y Mohan, 2011), así como en las vías de señalización mediados por BCR o receptores de citocinas (Abbas y col., 2012).

Las tablas 1,2 y 3, muestran los genes involucrados en el proceso de maduración del linfocito B, como genes que actúan para que la recombinación

en las cadenas IgH e IgL se lleven adecuadamente (Igk-V21, HMGB1), genes que codifican para proteínas necesarias para que los linfocitos B pasen de un estadio de maduración a otro (NRARP, Ikzf) y genes que codifican para proteínas que intervienen en la señalización del pre-BCR (Blnk, CSK).

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.33	S74563	Immunoglobulin kappa variable	Igk-V21
2.37	U43884	Inhibitor of DNA binding 1	ID1
-2.47	NM_010439	High mobility group box 1	HMGB1

Tabla 1. Desarrollo de linfocitos B. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a la hora de incubación, involucrados en el proceso de maduración de los linfocitos B.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.69	AF068182	B-cell linker	Blnk
2.24	NM_007783	c-src tyrosine kinase	CSK
2.06	AF318462	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	-
2.08	M58474	Ig heavy chain V region	-
2.15	NM_008714	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	NOTCH1
-2.80	AY046077	Notch-regulated ankyrin repeat protein	NRARP

Tabla 2. Desarrollo de linfocitos B. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 2hrs de incubación, involucrados en el proceso de maduración de los linfocitos B.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.13	AF068182	B-cell linker	Blnk
2.89	NM_009578	IKAROS family zinc finger 1	Ikzf
2.36	NM_011169	Prolactin receptor	PRLR
2.19	U43884	Inhibitor of DNA binding 1	ID1
2.26	NM_010496	Inhibitor of DNA binding 2	ID2
2.79	NM_008865	Prolactin family 3, subfamily b, member 1	PRL
2.15	S74563	Immunoglobulin kappa variable	Igk-V21
2.11	M37674	Immunoglobulin heavy chain (S107 family)	IGH

Tabla 3. Desarrollo de linfocitos B. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 4hrs de incubación, involucrados en el proceso de maduración de los linfocitos B.

Durante el análisis de microarreglos se encontró que la PRL modula la expresión de algunos genes que intervienen en diferentes vías de señalización. Las tablas 4, 5 y 6, muestran los genes modulados por la PRL que intervienen en la señalización de NF- κ B.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.82	AF294825	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12-member 13	TNFSF13
2.08	NM_011610	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	TNFRSF1B
2.34	AK009110	TNF receptor-associated factor 6	TRAF6
3.06	NM_019505	Diacylglycerol kinase, epsilon	DGKE

Tabla 4. Señalización de NFκB. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a la hora de incubación, involucrados en la señalización de NFκB.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
3.50	AB020974	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	NFKBIZ
2.75	NM_011529	TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	TANK
2.86	NM_019408	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	p52

Tabla 5. Señalización de NFκB. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 2hrs de incubación, involucrados en la señalización de NFκB.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
3.02	NM_019551	TRAF and TNF receptor associated protein	TTRAP
-2.03	NM_009403	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	TNFSF8
-2.08	NM_011529	TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	TANK

Tabla 6. Señalización de NFκB. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 4hrs de incubación, involucrados en la señalización de NFκB.

La PRL modifico de manera significativa la expresión de genes que intervienen en la vía de señalización MAPK a la hora y 4hrs de incubación (Tablas 7 y 8), no se encontró ningún gen modificado con un nivel significativo a las 2hrs de estímulo.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.26	NM_016961	Mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9
2.35	NM_010591	Jun oncogene	c-Jun
-2.54	M64429	Braf transforming gene	BRAF
-2.56	NM_013931	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	MAPK8IP3

Tabla 7. Vía de señalización MAP cinasas. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a la hora de incubación, involucrados en la vía de señalización MAPK.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.13	NM_016961	Mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9
2.09	NM_016700	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8
-2.35	NM_013931	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	MAPK8IP3
-3.04	M64429	Braf transforming gene	BRAF

Tabla 8. Vía de señalización MAP cinasas. Genes modulados por la PRL (50ng/ml) a las 4hrs de incubación, involucrados en la vía de señalización MAPK.

Dentro de la vía de señalización Jak/Stat la PRL incremento la expresión de un gen a las 4hrs de incubación (Tabla 9).

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.53	NM_008413	Janus kinase 2	Jak2

Tabla 9. Vía de señalización Jak/Stat. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 4hrs de incubación, involucrados en la vía de señalización JAK-STAT.

Otros genes que se vieron modificados por la PRL son los que intervienen en el proceso de apoptosis, que se muestran en las tablas 10,11 y 12.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
-2.06	NM_019752	HtrA serine peptidase 2	HtrA2/Omi

Tabla 10. Apoptosis. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a la hora de incubación, relacionados al proceso de apoptosis.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
2.97	NM_009689	Baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5
4.15	NM_007522	BCL2-associated agonist of cell death	Bad
2.49	NM_011826	HCLS1 associated X-1; silica-induced gene 111	HAX1
2.27	AY029253	BCL2 modifying factor	Bmf

Tabla 11. Apoptosis. Genes modulados por la PRL (50ng/ml) a las 2hrs de incubación relacionados al proceso de apoptosis.

Z	No. de acceso en GeneBank	Nombre	Abreviatura
-2.00	NM_008799	Programmed cell death 2	PDCD2
-2.42	AK003339	Programmed cell death 2-like	PDCD2L
-2.14	NM_009811	Caspase 6	CASP6

Tabla 12. Apoptosis. Genes modulados por la PRL (50ng/mL) a las 4hrs de incubación, relacionados al proceso de apoptosis.

Con la técnica de microarreglos se detectaron diferentes genes modificados por la PRL, sin embargo la expresión de estos genes se debe comprobar por otras técnicas con mayor sensibilidad (Ozkan y Heller, 2006) como RT-PCR tiempo real. Dentro de nuestros resultados la PRL incremento la expresión de 32 genes, en este trabajo no fue posible verificarlos todos, por lo que se escogieron únicamente dos.

Debido a la importancia que tiene en el proceso de linfopoyesis se escogió el factor de transcripción ikaros, que puede activar o reprimir distintos genes que

intervienen en el proceso de maduración de los linfocitos B. Por otra parte durante la maduración de los linfocitos B, las células que no tienen un re-arreglo de genes exitoso o reconocen auto-antígenos son eliminadas por apoptosis, nuestros resultados mostraron que la PRL incremento la expresión de genes tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Birc5). Se ha reportado que la PRL activa moléculas anti-apoptóticas como Bcl2 (Saha y col., 2011) por lo que se selecciono Birc5 para verificar su expresión, sin embargo, es importante verificar los demás genes.

La expresión de los 2 genes seleccionados se corrobora por RT-PCR tiempo real, además de verificar su expresión en la cepa C57BL/6 y en la cepa MRL.

Expresión relativa del gen *Ikzf1*

Los linfocitos B inmaduros provenientes de la cepa C57BL/6 presentaron una expresión baja del gen, sin cambios significativos a la hora de incubación con PRL (0.53 ± 0.03) con respecto a los linfocitos incubados con medio (0.52 ± 0.14). Mientras que a las 2 y 4hrs se observó un incremento con una diferencia estadística en los linfocitos incubados con PRL (2hrs: 0.42 ± 0.03 , 4hrs: 0.62 ± 0.05) con respecto a los incubados con medio (2hrs: 0.25 ± 0.02 ; 4hrs 0.39 ± 0.02) (Figura 11A).

En las cepas que desarrollan lupus (MRL, MRL/lpr) a diferencia de la cepa control, la PRL incremento la expresión del gen con una diferencia estadísticamente significativa a la hora de incubación (MRL: 1.54 ± 0.32 , MRL/lpr: 1.25 ± 0.16) con respecto al medio (MRL: 0.61 ± 0.03 , MRL/lpr: 0.82 ± 0.14). A las 2 y 4hrs de incubación con PRL no se observo cambio en la expresión del gen con respecto al medio en ninguna de las cepas que desarrollan lupus (MRL [2hrs: 0.47 ± 0.08 PRL vs 0.46 ± 0.06 medio] [4hrs; 0.79 ± 0.22 vs 0.78 ± 0.22], MRL/lpr [2hrs: 1.17 ± 0.04 vs 1.09 ± 0.09] [4hrs: 1.84 ± 0.08 vs 1.81 ± 0.20]) (Figura 11 B y C).

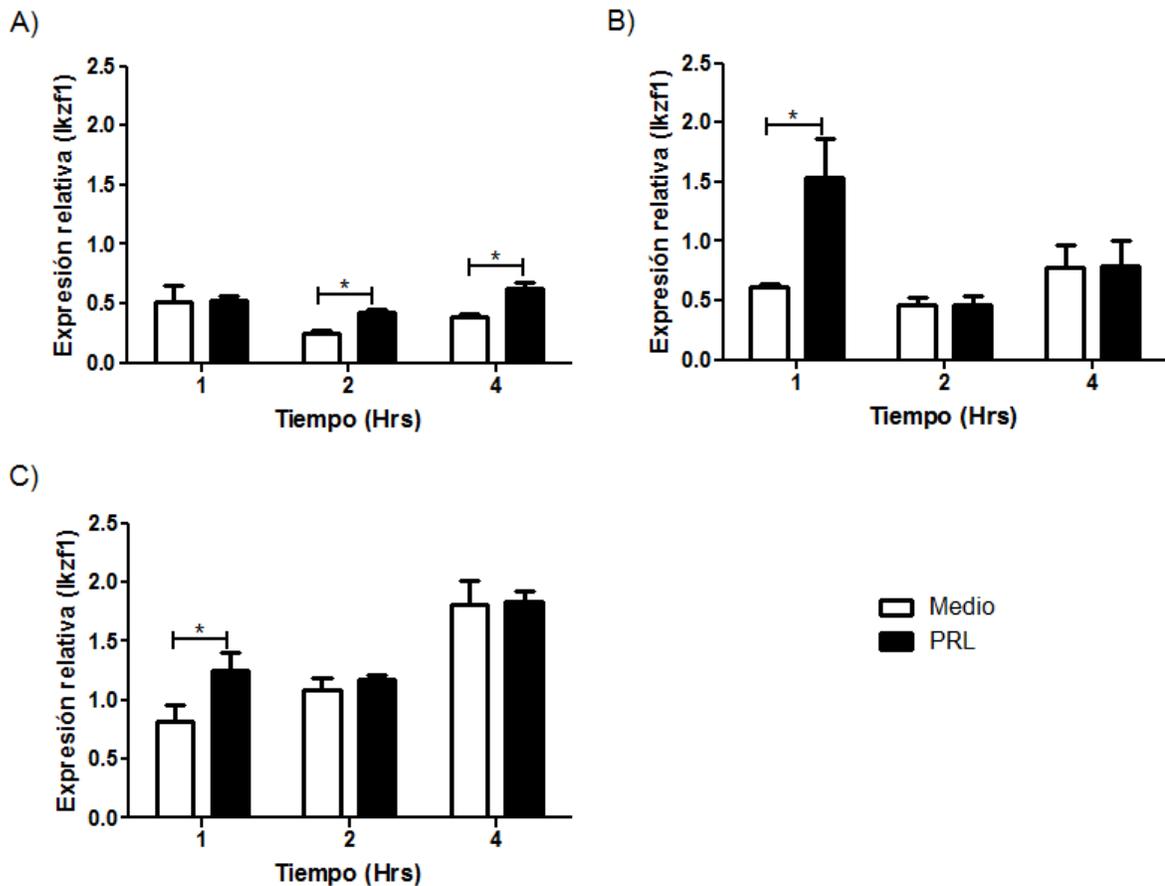


Figura 11. Expresión relativa del gen *Ikzf1* (Ikaros). Linfocitos B inmaduros se incubaron con PRL (50ng/ml) o medio a diferentes tiempos y por RT-PCR tiempo real se determinó la expresión relativa del gen en las distintas cepas. A) C57BL/6; B) MRL; C) MRL/lpr. * $p < 0.05$.

Expresión relativa del gen *Birc5*

En los linfocitos B inmaduros de la cepa control la PRL disminuyó la expresión de *Birc5* (0.16 ± 0.03) con respecto al medio (0.43 ± 0.01) a las 2hrs de incubación, mientras que a las 4hrs se observó un incremento de la expresión del gen en los linfocitos incubados con PRL (0.45 ± 0.01) con respecto al medio (0.28 ± 0.04). No existió cambio en la expresión del gen a la hora de incubación (PRL: 0.40 ± 0.08 , medio: 0.34 ± 0.01) (Figura 12A).

En la cepa MRL se observó una tendencia a incrementar la expresión del gen al incubar una hora con PRL (1.04 ± 0.25) con respecto al medio (0.66 ± 0.09), aunque el incremento no fue estadísticamente significativo. A las 2hrs de incubación la PRL (0.91 ± 0.20) incremento de manera significativa le expresión del gen con respecto al medio (0.52 ± 0.09). A las 4hrs no existió cambio en la expresión del gen al incubar con PRL (0.79 ± 0.11) o medio (0.99 ± 0.01) (Figura 12B).

En la cepa MRL/lpr, la expresión del gen aumento con una diferencia estadísticamente significativa a las 4hrs de incubación con PRL (1.35 ± 0.06) comparado con medio (0.85 ± 0.09). No existió cambios en la expresión del gen a la hora y 2hrs de incubación con PRL (1hr: 0.93 ± 0.14 , 2hrs: 0.83 ± 0.0), o medio (1hr: 0.76 ± 0.12 , 2hrs: 0.76 ± 0.12) (Figura 12C).

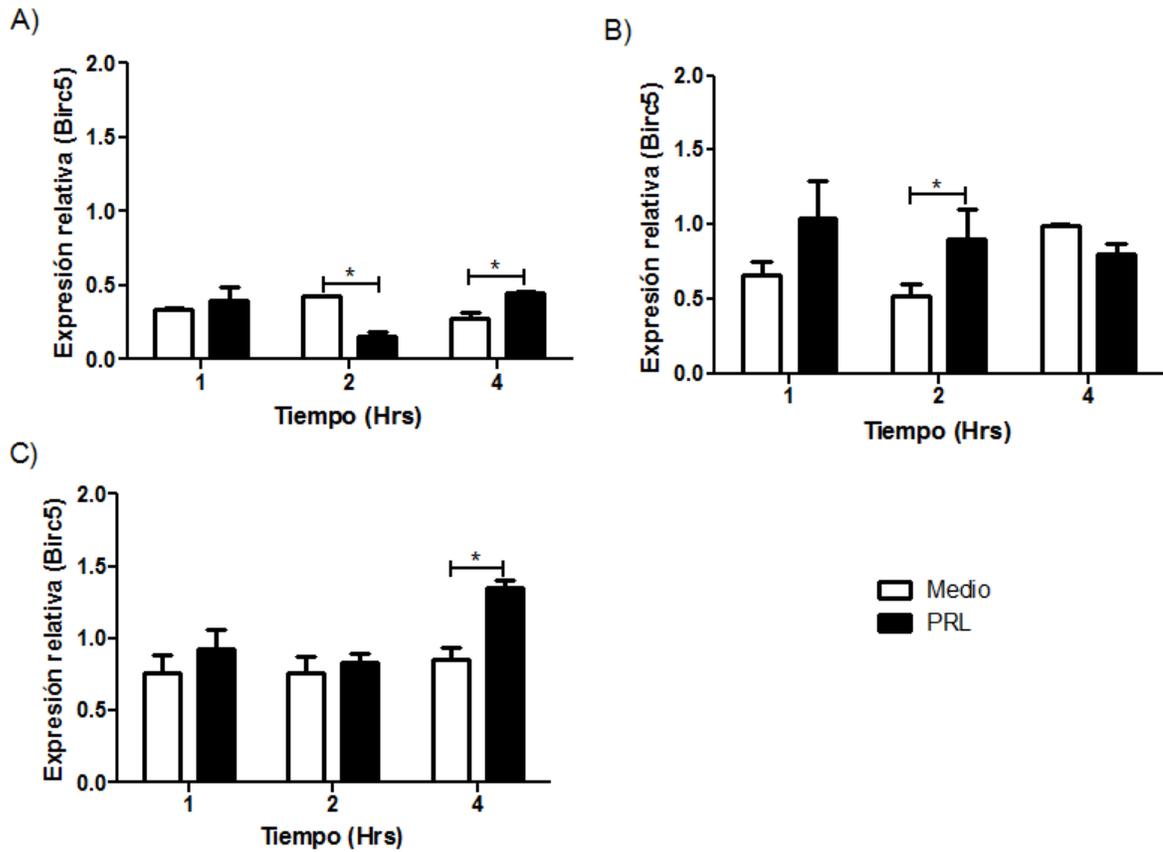


Figura 12. Expresión relativa del gen Birc5. Linfocitos B inmaduros se incubaron con PRL (50ng/mL) o medio a diferentes tiempos y por RT-PCR tiempo real se determinó la expresión relativa del gen en las distintas cepas. A)C57BL/6; B)MRL; C)MRL/lpr. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune, que presenta defectos en los mecanismos de tolerancia dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B (Basten y Silveira, 2010; Lamoureux y col., 2007). Diversos estudios han demostrado la importancia que tienen los linfocitos B (Grammer y Lipsky, 2003), así como la presencia de hormonas como la PRL en la aparición de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Leños y col., 2001). La PRL tiene diferentes funciones y participa en diversos procesos biológicos, cada una de estas funciones dependerá del tipo celular en donde se exprese su receptor (Binart y col., 2010). En este estudio se evaluaron los genes regulados por la PRL que intervienen en el proceso de maduración de linfocitos B de médula ósea en una cepa que desarrolla una enfermedad similar a lupus (MRL/lpr), que presenta una mutación en fas por lo que las manifestaciones de la enfermedad se presentan a más temprana edad y con mayor agresividad que en la cepa MRL, siendo la cepa MRL/lpr uno de los modelos más utilizados en el estudio de LES. A través de la técnica de microarreglos se determinaron los genes que pueden ser regulados por la PRL en los linfocitos B de médula ósea. Nuestros resultados mostraron que la PRL puede incrementar la expresión de más de 600 genes que intervienen en diferentes procesos. Sin embargo, para este estudio se seleccionaron solamente los genes que intervienen en el proceso de maduración de los linfocitos B de médula ósea (factores de transcripción, vías de señalización, apoptosis).

En 1993 se reportó que los linfocitos B de bazo expresan el receptor de PRL (Garnerault y col., 1993) y en estudios publicados en nuestro laboratorio se demostró que las diferentes poblaciones de linfocitos B en bazo (transitorios, foliculares y de zona marginal) expresan el receptor de PRL, siendo mayor la expresión en los linfocitos B que provienen directamente de médula ósea (transitorios-1) (Ledesma y col., 2012). Sugiriendo que los linfocitos B de médula ósea podrían expresar el receptor de PRL. Nuestros resultados mostraron que los linfocitos B inmaduros de médula ósea (constituidos por los

diferentes estadios de maduración pro-B, pre-B e inmaduros) expresan el mRNA del receptor de PRL por lo que pueden tener una respuesta al ser estimulados con PRL.

Al estimular con PRL a los linfocitos B inmaduros durante 4hrs se observó una sobre-expresión tanto del gen de la PRL como de su receptor, sugiriendo una retroalimentación positiva para la producción de la hormona. La unión de la PRL con su receptor induce la dimerización del mismo, activando las vías de señalización: PI3K/Akt, Jak/Stat y/o MAPK (Clevenger y col., 2009; Tripathi y Sodhi, 2008). Nuestros resultados sugieren que en los linfocitos B inmaduros la interacción PRL-receptor podría estar activando estas vías de señalización aunque en diferente tiempo. Nosotros encontramos un incremento en la expresión de MAPK9 (JNK2) a la hora y 4hrs de incubación y MAPK8 (JNK2) a las 4hrs, MAPK8 y MAPK9 son responsables de la fosforilación de factores de transcripción como el factor c-jun, el cual también presentó un incremento en su expresión a la hora de incubación al estimular con PRL. c-Jun es miembro de la familia AP-1 (por sus siglas en inglés activating protein-1), estas cinasas regulan una amplia gama de funciones celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis (Pearson y col., 2001). Por otro lado la interacción PRL-receptor incremento la expresión del gen que codifica para la proteína Jak2 a las 4hrs de estímulo, esta proteína forma parte de la vía de señalización Jak/Stat. Estos resultados nos sugieren que en los linfocitos B inmaduros, la PRL primero activa la vía de las MAPK y después la vía de Jak/Stat.

Se ha reportado que la PRL interviene en la señalización de NF- κ B (Olavarría y col., 2010), al igual que otras hormonas como los estrógenos (Garside y col., 2004). Nuestros resultados mostraron que el estímulo de PRL en los linfocitos B inmaduros sobre-expresa genes que codifican para proteínas que intervienen en la señalización de NF- κ B, como el receptor TNF (TNFRSF1B), TRAF6 (Meads y col., 2010) o genes de proteínas que regulan directamente a NF- κ B como el gen Nfkbiz que codifica a la proteína I κ B- ζ y el gen TANK que codifica para la proteína adaptadora ITRAF (Zhang y col., 2010). En los linfocitos B de

médula ósea se ha reportado que la activación de NF- κ B interviene en el proceso de maduración de los linfocitos B, ya que hay una mayor activación de NF- κ B en los linfocitos pre-B que en los pro-B. En linfocitos B inmaduros se observa una mayor señalización de NF- κ B, principalmente en las células donde se está llevando a cabo el mecanismo de edición de receptor (Kaileh y Sen, 2012), por lo que la PRL podría intervenir en el proceso de maduración del linfocito B al activar NF- κ B.

Durante el proceso de maduración de los linfocitos B se lleva a cabo el re-arreglo de genes de las inmunoglobulinas, nuestros resultados mostraron que los genes que codifican para la región constante y variable de la cadena pesada se encuentran sobre expresados a la hora de estimular con PRL, mientras que los genes de la región variable (κ) de la IgL se sobre-expresan a las 4hrs. La expresión de la IgH con la cadena ligera surrogada (λ 5 y Vpre-B) genera el pre-BCR, el cual comienza una cascada de señalización que da inicio a ciclos de proliferación celular, posteriormente se da lugar al re-arreglo de genes de la IgL para formar el BCR. Tanto en el pre-BCR como en el BCR la proteína Blnk es necesaria para la señalización (Oellerich y col., 2011). El gen que codifica para Blnk (BLNK) incremento a las 4hrs de incubación con PRL y la tirosina cinasa CSK a las 2hrs.

Otro gen que se encontró sobre-expresado fue *Ikzf1*, cuya proteína codificada Ikaros, es un factor de transcripción importante en la hematopoyesis pero con mayor expresión en la linfopoyesis. Tiene como blancos a las proteínas Rag 1 y 2, la exonucleasa TdT, λ 5, EBF además de actuar en paralelo con otros factores para que el proceso de maduración se lleve adecuadamente (Francis y col., 2011; Alinikula, 2010). El estímulo con PRL indujo un incremento en la expresión de su gen en los microarreglos y se decidió comprobar su expresión a través de RT-PCR tiempo real en la cepa C57BL/6, MRL/lpr y MRL. La expresión del gen *Ikzf1* mediante microarreglos y RT-PCR tiempo real en la cepa MRL/lpr, confirma la sobre-expresión del gen respecto al control, sin embargo no hubo correlación en cuanto al tiempo de expresión, esta variación

se puede explicar por la diferencia de sensibilidad entre ambas técnicas (Ozkan y Heller, 2006).

En las cepas que desarrollan lupus la expresión relativa de *Ikzf1* es mayor que en la cepa control. Tanto en las cepas que desarrollan lupus como en la cepa control la PRL incrementa su expresión. Sin embargo, la expresión es mayor y más rápida en las cepas que desarrollan lupus por lo que será interesante investigar si esto pudiera estar relacionado con la patología.

Un paso importante durante la maduración de los linfocitos B es la eliminación de las clonas auto-reactivas por tres mecanismos, edición del receptor, delección clonal (apoptosis) y anergia. La apoptosis es regulada por 2 familias de proteínas: la familia Bcl-2, que comprende miembros pro y anti-apoptóticos y la familia de proteínas inhibidora de la apoptosis (IAP). A nivel de bazo en ratones BALB/c R4A- γ 2b se ha reportado que los mecanismos de delección clonal y anergia en linfocitos B transitorios se ven afectados por la PRL (Saha y col., 2009). Además, se sabe que la PRL induce la expresión de Bcl2, proteína anti-apoptótica.

Nuestros resultados mostraron que la PRL interviene en la apoptosis ya que modula la expresión de genes tanto pro-apoptóticos (Bad y Bmf) como anti-apoptóticos (Birc5). Estudios previos reportan que la PRL estimula la expresión de genes supresores de apoptosis, como Bcl-2, Bcl-xL y XIAP (miembro de la familia IAP) (Krishnan y col., 2003). Nosotros no encontramos que la PRL indujera la expresión de estos genes en linfocitos B inmaduros, sin embargo, encontramos que la PRL sobre-expresa al gen Birc5 que codifica para la proteína Survivina que pertenece a la familia de inhibición de la apoptosis (IAP), funciona como regulador mitótico y como inhibidor de la apoptosis. Contiene sitios de unión en su promotor para Stat3. Actúa inhibiendo la caspasa 3 y 7 e induciendo la degradación de Smac/Diablo (Zhou y col., 2009; Dutta y col., 2006). Por lo que se decidió comprobar su expresión a través de RT-PCR tiempo real en una cepa control y en las cepas que desarrollan lupus. Mediante ambas técnicas se confirmó la sobre-expresión de este gen en la cepa MRL/lpr,

las diferencias en el tiempo de expresión como se menciono anteriormente, puede ser causa de la sensibilidad de la técnica (Ozkan y Heller, 2006). Los resultados por RT-PCR tiempo real mostraron que la expresión del gen Birc5 es mayor en las cepas que desarrollan lupus con respecto a la cepa control, además de que la PRL induce una mayor expresión del gen en las cepas que desarrollan lupus, estos resultados nos pueden sugerir que en las cepas que desarrollan lupus la PRL este incrementando la expresión de Birc5 (inhibidor de la apoptosis) y por lo tanto salvando a las clonas auto-reactivas de la apoptosis. Por lo que será interesante experimentalmente demostrar si la PRL puede salvar a las clonas auto-reactivas a través de Birc5 y favorecer las manifestaciones de lupus.

CONCLUSIONES

- Los linfocitos B de médula ósea expresan el mRNA del receptor de PRL.
- Se induce la expresión del gen de la PRL por la misma PRL.
- La PRL modula la expresión de genes que intervienen en las vías de señalización de MAPK y Jak/Stat.
- La PRL modula la expresión de genes que intervienen en la señalización de NFκB, en apoptosis, así como en la maduración de los linfocitos B.
- La expresión de los genes *Ikzf1* y *Birc5*, inducida por la PRL es mayor en las cepas que desarrollan una enfermedad similar al lupus con respecto a la cepa control.

PERSPECTIVAS

Con este trabajo se demostró que la PRL modula la expresión de diversos genes en una cepa que desarrolla lupus. Por lo cual será importante determinar si los genes inducidos por la PRL como *Ikzf1* y/o *Birc5* tienen un papel importante en la exacerbación de la enfermedad, alterando la maduración de las células y/o salvando clonas auto-reactivas.

ANEXO

Preparación de reactivos

Medio AIMV (L-glutamina, sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina)

- Medio AIMV 50 mL
- Antibióticos 100X 500 µL
- Piruvato 100x 500 µL
- 2 mercaptoetanol 1000x 50 µL

Medio RPMI

- Medio RPMI 500 mL
- BSA 20% 12.5 mL
- EDTA 0.5 M 2 mL

PBS 10X pH 7.4

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

Regulador MACS

- PBS 1X 50 mL
- BSA 20% 1.25 mL
- EDTA 0.5 M 200 µL

Regulador FACS

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

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Elsevier USA.
- Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., Nagata, S. (1996). Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. PNAS 93:2131-2136.
- Alinikula, J. (2010). Regulation of B cell gene expression and function by Ikaros, Helios and Bcl6. University of Turku, Tom. 935
- Allman, D. y Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. Curr. Opin. Immunol. 20:149-157.
- Andrews, B., Eisenberg, R., Theofilopoulos, A., Izui, S., Wilson, C., McConahey, P., Murphy, E., Roths, J., Dixon, F. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J. Exp. Med. 148:1198-1215.
- Basten, A. and Silveira, A. (2010). B cell tolerance: mechanisms and implications. Curr. Opin. Immunol. 22:566-574.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C., LaPensee, E. (2008). What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans?. Endocr. Rev. 29: 1–41.
- Ben-Jonathan, N., Liby, K., McFarland, M., Zinger, M., (2002). Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. TEM 13: 245–250.
- Bernichtein, S., Touraine, P., Goffin, V., (2010). New concepts in prolactin biology. J. Endocrinol. 206: 1–11.
- Binart, N., Bachelot, A., Bouilly, J., (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. TEM 21: 362-368.
- Blanco, F., Quintal, G., Leaños, A. (1999). Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. J. Rheumatol. 26:55-59.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways

and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19:225-268.

- Bolyakov, A. y Paduch, D.A. (2011). Prolactin in men's health and disease. *Curr. Opin. Nephrol.* 21:527–34.
- Bouchard, B., Ormandy, C., Di-Santo, J., Kelly, P. (1999). Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 163:576-582.
- Carreno, P., Sacedon, R., Jimenez, E., Vicente, A., Zapata, A. (2005). Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol.* 160:135-145.
- Chavez-Rueda K., Legorreta Haquet M.V., Cervera C.H., Sánchez L., Jara L.J., Zenteno E., Blanco-Favela F. (2005). Prolactine effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from lupus erithematosus patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23:769-777. **A**
- Chavez-Rueda, K., Hernandez, J., Zenteno, E., Leaños-Miranda, A., Legorreta-Haquet, M., Blanco-Favela, F. (2005). Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin. Immunol.* 116:182-191. **B**
- Clevenger, C., Gadd, S., Zheng, J., (2009). New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *TEM* 20: 223-229.
- De Laurentiis, A., Pisera, D., Caruso, C., Candolfi, M., Mohn, C., Rettori, V., Seilicovich, A. (2002). Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic pituitary axis. *Neuroimmunomod.* 10:30-39.
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., Gélinas, C., (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-κB. *Oncogene* 25:6800–6816.
- Francis, O., Payne, J., Su, R., Payne, K., (2011). Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World J. Biol. Chem.* 2:19-125.

- Freeman, M., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy G. (2000). Prolactin: structure function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80:1523-1631.
- Fried, A. y Bonilla, F., (2009). Infections of Primary Antibody Deficiencies and Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:396.
- Furukawa, F. y Yoshimasu, T. (2005). Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 4:345-350.
- Gagnerault, M., Touraine, P., Savino, W., Kelly, P., Dardenne, M. (1993). Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J. Immunol.* 150:5673-81.
- Garside, H., Stevens, A., Farrow, S., Normand, C., Houle, B., Berry, A., Maschera, B., Ray, D. (2004). Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 279:50050–50059.
- Grammer, A. y Lipsky, E. (2003). B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rev. Ther Suppl* 4:S22-S27.
- Grimaldi, C., Hill, L., Xu, X., Peeva, E., Diamond, B. (2005). Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol. Immunol.* 42: 811–820.
- Hartmann, D.P., Holaday, J.W., Bernton, E.W. (1989). Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J.* 3:2194–202.
- Herzog, S., Reth, M., Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 9:195-205.
- Horiguchi, K., Yagi, S., Ono, K., Nishiura, Y., Tanaka, M., Ishida, M., Harigaya, T. (2004). Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *J. Endocrinol.* 183:639-646.
- Horseman, D., Zhao, W., Montecino, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S., Smith, F., Markoff, E., Dorshkind, K. (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16:6926-6935.

- Kaileh, M. y Sen, R. (2012). NF- κ B function in B lymphocytes. *Immunol. Rev.* 246:254–271.
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (2007). *Kuby Immunology*. 6th ed. W.H. Freeman and Company. N.Y, USA.
- Kirk, A., Turgeon, N., Iwakoshi, N., (2010). B cells and transplantation tolerance. *Nat. Rev. Nephrology* 6:584-593.
- Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D., Horseman, N., y Buckley, A. (2003). Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144: 2102–2110.
- Kurosaki, T. (2002). Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr. Opin. Immunol.* 14:341-347.
- Lamoureux, J., Watson, L., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., Feeney, A. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* 204:2853-2864.
- Leaños, A., Pascoe, D., Chavez, K., Blanco, F. (2001). Detection of macroprolactinemia with the polyethylene glycol precipitation test in systemic lupus erythematosus patients with hyperprolactinemia. *Lupus* 10:340-345.
- Ledesma, Y., Blanco, F., Fuentes, E., Tesoro, E., Hernández, R., Arriaga, L., Legorreta, M., Montoya, E., Chávez, L., Castro, M., Chávez, A., (2012). Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment. *BMC Immunol.* 13:11.
- Lipsky, E. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2:764-766.
- Mandel, E. y Grosschedl, R. (2010). Transcription control of early B cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 22:161–167.
- Martelli, AM., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, PL., Evangelisti, C., Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20:911–928.

- Martensson, I., Keenan, R., Licence, S. (2007). The pre-B cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 19:137–142.
- Matthias, P. y Rolink, A. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 5:497-508.
- Mayani, H., Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J., Guzmán, P., González, A., (2007). Hematopoiesis. *Cancerología* 2: 95-107.
- McMurray, R. (2001). Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus J. Immunol.* 10:742-747.
- McMurray, R., Keisler, D., Kanuckel, K., Izui, S., Walker, E. (1991). Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J. Immunol.* 147:3780.
- Meads, Mark., Li, Z., Dalton, W., (2010). A novel TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) binding domain mediates NF- κ B signaling by the common cytokine receptor β subunit. *J. Immunol.* 185:1606–1615.
- Meffre, E. y Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20:632-638.
- Montgomery, D.W., Zukoski, C.F., Shah, G.N., Buckley, A.R., Pacholczyk, T., Russell, D.H. (1987). Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:692–8.
- Morales, P., Carretero, M., Geronimo, H., Copín, S., Gaspar, M., Marcos, M., Martín, J. (1999). Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell. Growth. Differ.* 10:583-590.
- Murphy, K., Travers, Paul., Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. Garland Science. N.Y, USA.
- Oellerich, T., Bremes, V., Neumann, K., Bohnenberger H., Dittmann, K., Hsiao, H., Engelke, M., Schnyder, T., Batista, F., Urlaub, H., Wienands, J., (2011). The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO J.* 30:3620–3634.
- Olavarría, V., Sepulcre, M., Figueroa, J., Mulero, V. (2010). Pathways Involves Jak/Stat and NF- κ B Signaling from the Bony Fish Gilthead

Seabream Oxygen Species and IL-1 b in Leukocytes Prolactin-Induced Production of Reactive. *J. Immunol.* 185:3873-3883.

- Orbach, H. y Shoenfeld, Y. (2006). Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 6:537-542.
- Ozkan, M. y Heller, M. (2006). *Micro/Nano Technologies for Genomics and Proteomics. Volúmen II, Springer USA.*
- Pacilio, M., Migliaresis, S., Meli, R., Ambrosone, L., Bigliardo, B., Di Carlo, R. (2001). Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus association with disease activity. *J. Rheumatol.* 28:2216-2221.
- Pathak, S. y Mohan, C. (2011). Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Res. THER.* 13:241.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M., (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* 22:153–183.
- Peeva, E., Michael, D., Creary, J., Rice, J., Chen, X., Diamond, B. (2003). Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J. Clin. Investi.* 111:2.
- Pérez, P., Reyes, A., Fuentes, E. (2011). Signaling proteins and transcription factors in normal and malignant early B cell development. *Bone Marrow Res.* 2011:1-10.
- Petri, M. (2008). Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:412-415.
- Pillai, S., Mattoo, H., Cariappa, A. (2011). B cells and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 23:721-731.
- Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, A., Goffin V. (2006). A new mechanism for prolactin (PRL) processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol. Endocrinol.* 20:3263-3278.
- Ramírez, J., Lukin, K., Hagman, J., (2010). From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr. Opin. Immunol.* 22:177–184.

- Rodak, B. (2005). Hematología. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. 2nd ed. Médica Panamericana Argentina.
- Saha, S., Gonzalez, J., Rosenfeld, G., Keiser, H., Peeva, E. (2009). Prolactin Alters the Mechanisms of B Cell Tolerance Induction. *Arthr. Rheum.* 60:1743–1752.
- Saha, S., Tieng, A., Pepeljugoski, P., Zandamn-Goddard, G., Peeva, E. (2011). Prolactin, Systemic Lupus Erythematosus, and Autoreactive B Cells: Lessons Learnt from Murine Models. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 40:8–15.
- Sun, R., Gault, R., Welniak, L., Tian, Z., Richards, S., Murphy, J. (2003). Immunologic and hematopoietic effects of recombinant human prolactin after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 9:426-434.
- Thomas, M., Srivastava, B., Allman, D. (2006). Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell. Immunol.* 239:92–102.
- Tripathi, A. y Sodhi, A. (2008). Prolactin induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAP kinase pathways. *Int. Immunol.* 20:327-336.
- Van Zelm, M., Van der Burg, M., Ridder, R., Barendregt, B., Haas, E., Reinders, M., Lankester, A., Révész, T., Staal, F., Van Dongen, J. (2005). Ig Gene Rearrangement Steps Are Initiated in Early Human Precursor B Cell Subsets and Correlate with Specific Transcription Factor Expression. *J. Immunol.* 175:5912–5922.
- Venkatesh, J., Peeva, E., Xu, X., Diamond, B. (2006). Cutting Edge: Hormonal Milieu, Not Antigenic Specificity, Determines the Mature Phenotype of Autoreactive B Cells. *J. Immunol.* 176:3311-3314.
- Von Boehmer, H. y Melchers, F. (2010). Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 11:1.
- Watanabe, R., Brannan, C., Copeland, N., Jenkins, N., Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nat.* 356:314-317.

- Watters, T., Kenny, E., O'Neill, L. (2007). Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol. Cell Biol.* 85:411-419.
- Yurasov, S., Tiller, T., Tsuiji, M., Velinzon, K., Pascual, V., Wardemann, H., Nussenzweig, M. (2006). Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J. Exp. Med.* 203:2255-2261.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., Nussenzweig M. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201:703-711.
- Zhang, W., Wang, J., Zhang, Y., Yuan, Y., Guan, W., Jin, C., Chen, H., Wang, X., Yang, X., He, F., (2010). The Scaffold Protein TANK/I-TRAF Inhibits NF- κ B Activation by Recruiting Polo-like Kinase 1. *Mol. Biol. Cell* 21:2500–2513.
- Zhou, J., Bi, C., Janakakumara, J., Liu, S., Chng, W., Tay, K., Poon, L., Xie, Z., Palaniyandi, S., Yu, H., Glaser, K., Albert, D., Davidsen, S., Chen, C. (2009). Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood* 113:4052-4062.
- Zhu, L., Yang, X., Yu, X. (2010). Anti-TNF- α Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:1-8.
- Zwollo, P. (2011). Dissecting Teleost B Cell Differentiation Using Transcription Factors. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 898–905.