



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN CÉLULAS TH17  
PROCEDENTES DE RATONES QUE DESARROLLAN UNA ENFERMEDAD  
SIMILAR A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**ERIKA ALEJANDRA MOLINA GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia

SECRETARIO: Profesor: Adriana Karina Chávez Rueda

1er. SUPLENTE: Profesor: Gibran Pérez Montesinos

2° SUPLENTE: Profesor: Gustavo Olvera García

**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. El mantenimiento de los animales de estudio se llevó a cabo en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", y con los financiamientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (150766, 226292).

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

### **SUSTENTANTE:**

---

Erika Alejandra Molina García

# ÍNDICE

pág.

Índice de figuras .....	i
Abreviaturas .....	ii
Resumen .....	1
Introducción .....	3
Justificación e Hipótesis .....	16
Objetivos.....	17
Material y métodos .....	18
Diagrama de flujo .....	23
Resultados.....	24
Discusión .....	32
Conclusiones .....	35
Perspectivas .....	36
Referencias .....	37
Anexo .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>pág.</b>
Figura 1	Diferenciación de los diferentes tipos de células T CD4.	4
Figura 2	Citocinas y quimiocinas producidas por células Th17 y sus células blanco.	5
Figura 3	Diferencias entre las células Th17 “clásicas” y Th17 “alternas”.	6
Figura 4	La patogénesis del LES.	9
Figura 5	Estructura terciaria de la prolactina.	11
Figura 6	Secreción de prolactina por metoclopramida.	11
Figura 7	Receptor de prolactina e isoformas.	12
Figura 8	Mecanismo de activación del receptor de prolactina por dimerización inducida por prolactina.	13
Figura 9	Inducción de hiperprolactinemia.	24
Figura 10	Manifestaciones de LES en ratones con hiperprolactinemia.	25
Figura 11	Niveles séricos de IL-17.	26
Figura 12	Expresión del receptor de prolactina en células T CD4 “naive” y T efectoras.	27
Figura 13	Purificación de células T CD4 “naive”.	28
Figura 14	Expresión del receptor de prolactina en células T CD4 “naive” y en células T CD4+ incubadas con medio y activadas.	29
Figura 15	Porcentaje de células CD4+RORyt+.	30
Figura 16	Expresión del receptor de prolactina en células CD4+RORyt+ y CD4+RORyt-.	31

## ABREVIATURAS

AP	Fosfatasa alcalina
APC <sub>1</sub>	Célula presentadora de antígeno
APC <sub>2</sub>	Aloficocianina
BAFF	Factor de activación de las células B
BSA	Albúmina sérica bovina
CBA	Inmunoensayo de unión a perlas
CC	Quimiocina tipo CC
CCL	Quimiocina tipo CCL
CCR	Receptor de quimiocina
CD	Molécula de diferenciación
CXCL	Quimiocina tipo CXCL
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribunucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
EAE	Enfermedad experimental autoinmune
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FACS	Citometría de flujo (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	Del inglés, forkhead box P3

GATA	Factor de transcripción donde G= Guanina, A= Adenina y T= Timina
G CSF	Factor estimulantes de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
JAK2	Janus quinasa 2
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LES	Lupus eritematoso sistémico
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NK	Células asesinas naturales
NOM	Norma oficial mexicana
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PRL	Prolactina
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
ROR <sub>c</sub>	Del inglés, RAR- related orphan receptor c
ROR <sub><math>\gamma</math>t</sub>	Del inglés, RAR- related orphan receptor gamma t
rpm	Revoluciones por minuto

STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TCR	Receptor de células T
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Th	Célula T cooperadora
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Treg	Células T reguladoras

## RESUMEN

**Introducción.** Las células T CD4<sup>+</sup> intervienen en la respuesta inmune y se dividen en Th1, Th2, Th17 y Treg en base a las citocinas que producen y los factores de transcripción que expresan. Las células Th17 expresan el factor de transcripción ROR $\gamma$ t y secretan IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 y aunque son importantes en la inmunidad contra bacterias y hongos, se ha demostrado que juegan un papel central en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES). LES es una enfermedad autoinmune multifactorial en donde los pacientes presentan defectos en la tolerancia (central y periférica) dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos B como de T. Afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer:hombre de 9:1) en edad reproductiva, este predominio del sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas como la prolactina (PRL). La PRL es producida por las células de la hipófisis anterior y de manera extra-hipofisiaria por distintas células como los linfocitos T y B, los cuales también son capaces de expresar su receptor. Se sabe que tanto en pacientes como en ratones que desarrollan lupus (NZB/NZW, MRL, MRL/lpr) los niveles séricos de IL-17 se encuentran elevados y correlacionan con la actividad de la enfermedad, por otro lado se sabe que el estado de hiperprolactinemia exacerba la enfermedad. Además, se ha reportado que la PRL incrementa la expresión de citocinas como IL-6 (importante en la diferenciación de células Th17). Por lo que resulta interesante investigar si la PRL favorece la diferenciación de células Th17 en ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus, para lo cual primero es importante determinar si las células Th17 expresan el receptor de PRL.

**Objetivo.** Determinar la expresión del receptor de prolactina en linfocitos Th17 de ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus.

**Material y métodos.** Se emplearon ratones de 9 semanas de edad de las cepas C57BL/6 (cepa control), MRL y MRL/lpr (cepas que desarrollan una enfermedad similar a lupus), se trataron durante 6 semanas con metoclopramida para inducir hiperprolactinemia. Se determinó la exacerbación de la enfermedad determinando los niveles de proteinuria (tiras reactivas), concentraciones séricas de anticuerpos anti-dsDNA (ELISA) y de IL-17 (CBA). Por otro lado, se purificaron las células T CD4 "naive" (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) de bazo utilizando perlas magnéticas (MACS), se activaron (con anticuerpos anti-CD3) y diferenciaron con: TGF- $\beta$ , IL-6, y

anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-4. Se comprobó la diferenciación a Th17 al determinar la expresión de ROR $\gamma$ t por citometría de flujo. La expresión del receptor de PRL se realizó por citometría de flujo.

**Resultados y discusión.** Los niveles séricos de anticuerpos anti-dsDNA, proteinuria e IL-17 aumentaron en un estado de hiperprolactinemia en ratones MRL y MRL/lpr a diferencia de la cepa control sugiriendo que la PRL participa de manera importante en el desarrollo y exacerbación de LES. Las células Th17 (CD4+ROR $\gamma$ t+) expresaron el receptor de prolactina en mayor proporción que las células con el fenotipo CD4+ROR $\gamma$ t-. Además la expresión del receptor de PRL fue mayor en las cepas MRL y MRL/lpr comparados con la cepa control.

**Conclusión.** El estado de hiperprolactinemia en ratones MRL y MRL/lpr incrementa los niveles séricos de IL-17. Las células T CD4 “naive” (CD4+CD62L+CD25-) expresan menor receptor de PRL que las CD4+CD62L-CD25-. Las células Th17 expresan el receptor de PRL en mayor proporción que las células T CD4+ROR $\gamma$ t-.

# INTRODUCCIÓN

## Th17

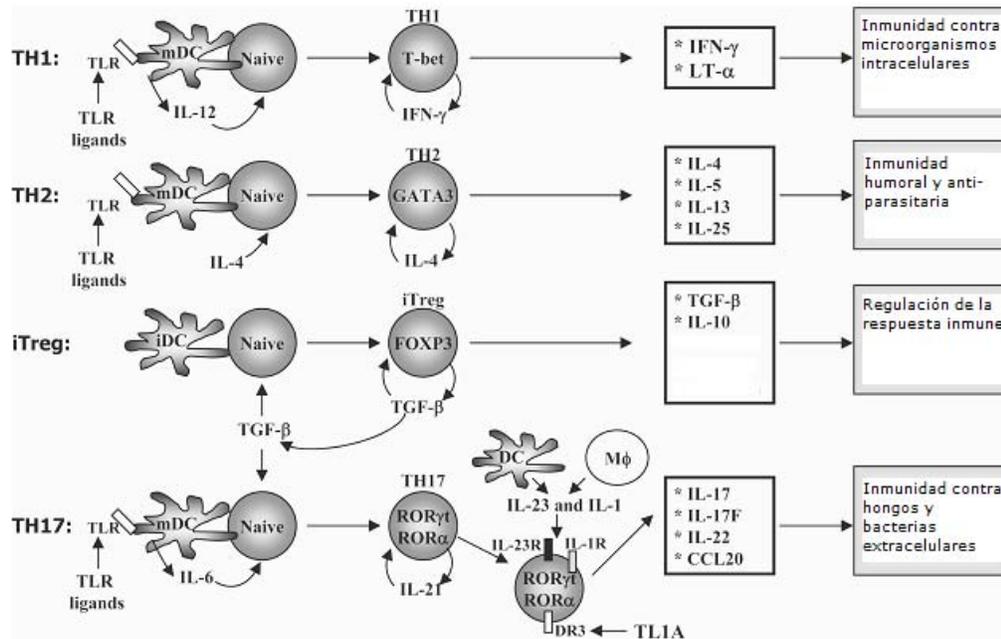
Las células T que emigran del timo son células maduras que expresan un único tipo de TCR (receptor de células T), la molécula CD4 o CD8 y circulan en la sangre en estado de reposo. Estos linfocitos se denominan linfocitos vírgenes (“naive”), ya que no han encontrado aún su antígeno específico. Las células T vírgenes se extravasan en los órganos linfáticos secundarios (ganglios linfáticos, bazo y tejido linfático asociado a mucosas) a fin de encontrar el antígeno. En los órganos linfáticos secundarios, las células T vírgenes interactúan con las células dendríticas a fin de reconocer los péptidos antigénicos presentados por las moléculas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad). Si reconocen estos péptidos, las células se activan, se expanden (expansión clonal) y se diferencian en linfocitos T efectores (Fainboim y Geffner, 2011).

Las células T CD4<sup>+</sup> efectoras pueden dividirse en Th1, Th2, Treg y Th17 basados en el patrón de secreción de citocinas y el factor de transcripción que expresan. Las células Th1 producen IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que las Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13. En cambio las células Treg secretan IL-10 y TGF- $\beta$  (Fainboim y Geffner, 2011; Harrington y col., 2006; Martínez y col., 2008). Las células Th17 son una nueva clase de células T CD4<sup>+</sup> descritas en el 2005, su principal factor de transcripción es ROR $\gamma$ t y secretan IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-26 (ésta última solo en humanos). TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, e IL-23 están involucradas en el desarrollo y/o expansión de las células Th17, mientras que IFN- $\gamma$  e IL-4, citocinas clave requeridas para la diferenciación a Th1 y Th2 respectivamente, suprimen el desarrollo de las células Th17 (Annunziato y col., 2009; Annunziato y col., 2012; Schmidt y col., 2007).

### Diferenciación de las células Th17

*In vitro*, la presencia de las citocinas TGF- $\beta$  e IL-6 promueven la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> “naive” a Th17 que expresan STAT-3 y ROR $\gamma$ t (figura 1), (Martínez y col., 2008; Waite y col., 2012). TGF- $\beta$  previene la diferenciación a Th1 y Th2 al suprimir la expresión de STAT-4 y GATA-3 (Shah y col., 2010). Se ha demostrado que TGF- $\beta$  e IL-6 promueven la expresión de IL-21R (receptor de IL-21) e IL-23R por un mecanismo que implica ROR $\gamma$ t. Además, la expresión de IL-21 por las células Th17 actúa de manera autócrina para promover la

diferenciación a Th17, mientras que el incremento de la expresión de IL-23R permite la señalización de IL-23 para mantener la actividad y supervivencia de las células Th17 (Harrington y col., 2006; Waite y col., 2012). Las citocinas necesarias para la diferenciación a Th17, IL-6, IL-21 e IL-23 señalizan a través de STAT-3 lo cual incrementa la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t (Perry y col., 2011).



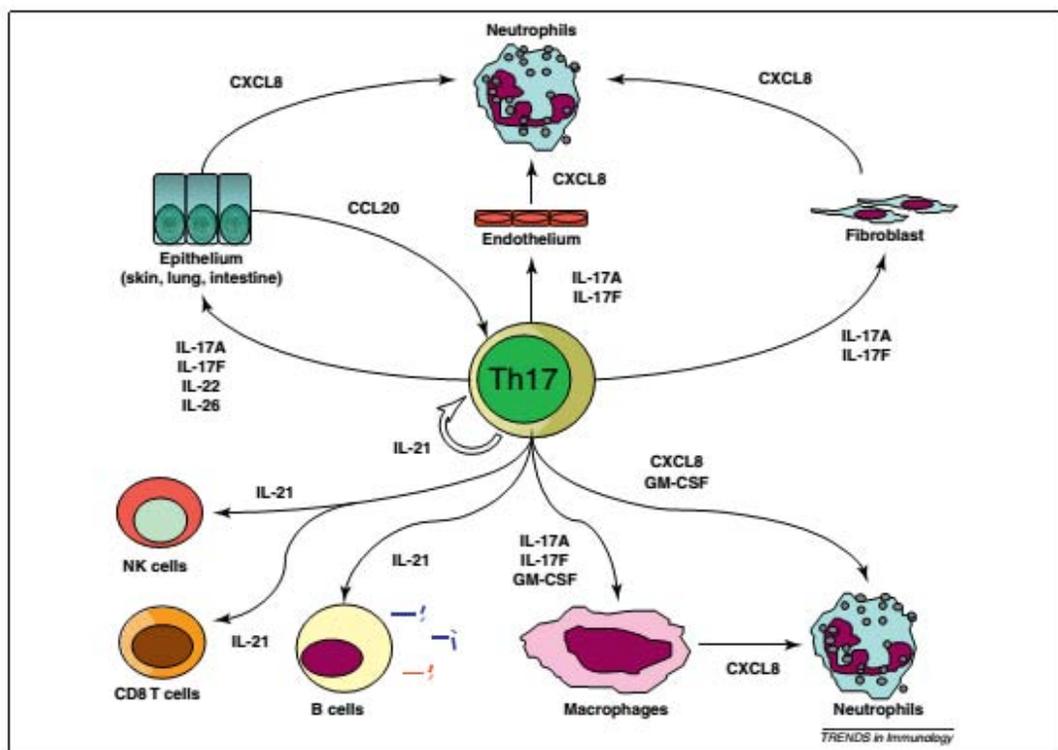
**Figura 1. Diferenciación de los diferentes tipos de células T CD4.** Diferenciación de células T CD4+ "naive" en células T efectoras (Th1, Th2, Th17, Treg) caracterizadas por su perfil de producción de citocinas, factores de transcripción y sus funciones (modificada de Martínez y col., 2008).

## IL-17A e IL-17F

IL-17A e IL-17F son las citocinas mejor caracterizadas de la familia de citocinas de IL-17 (IL-17A [IL-17], IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F). Ambos existen como homodímeros o como heterodímeros IL-17A/IL-17F, con una actividad biológica semejante tanto en células del sistema inmune como en otros sistemas y juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias (figura 2). Los receptores para estas citocinas son IL-17RA e IL-17RC. (Nalbandian y col., 2009; Perry y col., 2011). Tanto IL-17A como IL-17F pueden mediar la producción de IL-6, CCL3 y G-CSF en macrófagos, pero solo IL-17A puede activar CCL2, IL-1 $\beta$ , IL-17p70, e IL-9. IL-17A e IL-17F son responsables

de la proliferación, maduración y reclutamiento de neutrófilos. Inducen protección inmunológica al producir péptidos antimicrobianos y proteínas de fase aguda contra diferentes patógenos (Alunno y col., 2012; Annunziato y col., 2012; Perry y col., 2011; Schmidt y col., 2007). El factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) producidas por las células Th17 también contribuyen a la activación, sobrevivencia y reclutamiento de neutrófilos (Annunziato y col., 2012).

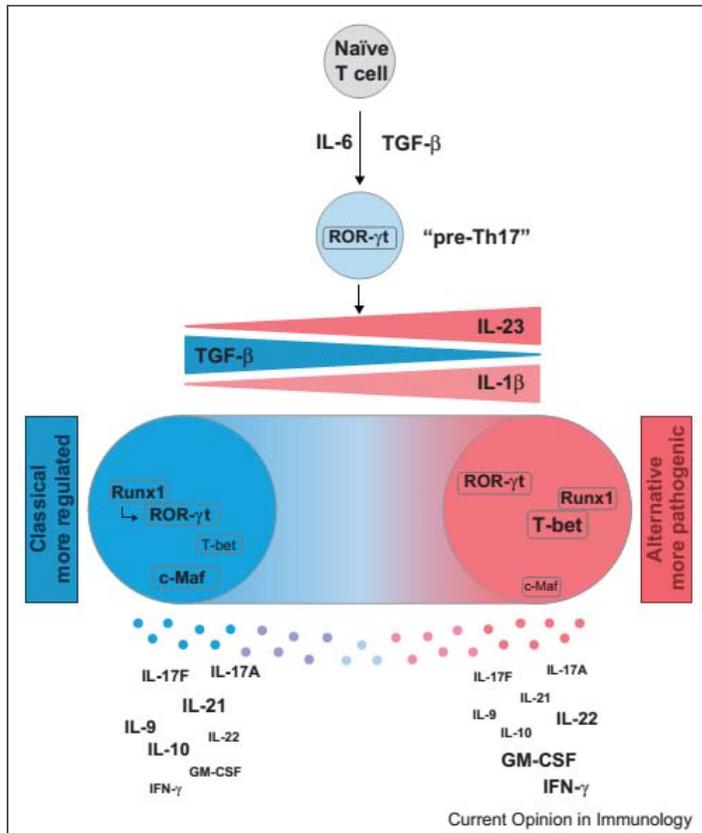
En inflamación crónica diversos tipos celulares producen CCL20 en respuesta a IL-17. CCL20 se une a su receptor CCR6, (el cual está expresado en células Th17), permitiendo una mayor atracción y reclutamiento de células Th17 al sitio de inflamación. Las células Th17 por si mismas son capaces de producir CXCL8 y CCL20 (Annunziato y col., 2012).



**Figura 2. Citocinas y quimiocinas producidas por células Th17 y sus células blanco.** Producción de citocinas y quimiocinas por las células Th17 con efecto en diferentes tipos celulares. IL-17A e IL-17F inducen en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos la producción de CXCL8, la cual es importante en el reclutamiento de neutrófilos. Un efecto similar es inducido por IL-22 e IL-26 en células epiteliales. Las células Th17 son capaces de reclutar neutrófilos mediante la producción de CXCL8 por macrófagos a través de una combinada actividad de IL-17A, IL-17F y GM-CSF, así como la producción de CXCL8 y GM-CSF. IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26 también estimulan células epiteliales al producir CCL20 que resulta en el reclutamiento de las mismas células Th17. IL-21 activa las células NK y T CD8+, y es un factor estimulante de células B. IL-21 provee un circuito de amplificación autocrina de las mismas células Th17 (Annunziato y col., 2012).

## Células Th17 clásicas y alternas

Se ha demostrado que las células Th17 son importantes en la protección contra hongos y bacterias extra-celulares. Sin embargo, en enfermedades autoinmunes también son importantes en la progresión de la enfermedad. Por lo que diferentes estudios han demostrado la plasticidad que pueden tener estas células, la cual depende del ambiente de citocinas donde se diferencien. Las células Th17 convencionales (no patógenas) son diferenciadas por TGF- $\beta$  e IL-6, expresan altos niveles de IL-10, CCL20 y CCR6, además de IL-17A e IL-17F, esta clase de células tienen una importante función en la defensa del hospedero contra patógenos extracelulares (figura 3). Mientras las células Th17 no clásicas (alternas o patógenas) requieren de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  para su diferenciación. IL-21 es indispensable para el desarrollo y la expansión tanto de las células Th17 clásicas como no clásicas. Las células Th17 no clásicas se caracterizan por la expresión de CCL9 y CXCR3, la secreción de IL-22, IFN- $\gamma$  y GM-CSF, así como la expresión de T-bet el cual es el principal factor de transcripción de las células Th1 y controla la expresión de IFN- $\gamma$ . Estas células son particularmente importantes en la inflamación crónica y en la autoinmunidad (Peters y col., 2011).



**Figura 3. Diferencias entre las células Th17 “clásicas” y Th17 “alternas”.**

Las citocinas que promueven la diferenciación de células Th17 patógenas y no patógenas son diferentes, además de los factores de transcripción que expresan (Peters y col., 2011).

## **Células Th17 en enfermedades autoinmunes**

Desde su descubrimiento, se ha demostrado la importancia de las células Th17 en múltiples tipos de enfermedades, desde enfermedades infecciosas hasta enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes. Entre las enfermedades autoinmunes se encuentra la esclerosis múltiple, que es causada por células T auto-reactivas específicas para componentes de las vainas de mielina. En el modelo de ratón de esta enfermedad (enfermedad experimental autoinmune [EAE]) diversos estudios han demostrado el papel de las células Th17 no clásicas en la patogenia de la enfermedad. En artritis reumatoide, enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que afecta principalmente las articulaciones causando degradación del cartílago y erosión ósea que termina en la destrucción de las articulaciones, se ha demostrado un papel clave de IL-17 o IL-23 en la progresión de la enfermedad (Martínez y col., 2008).

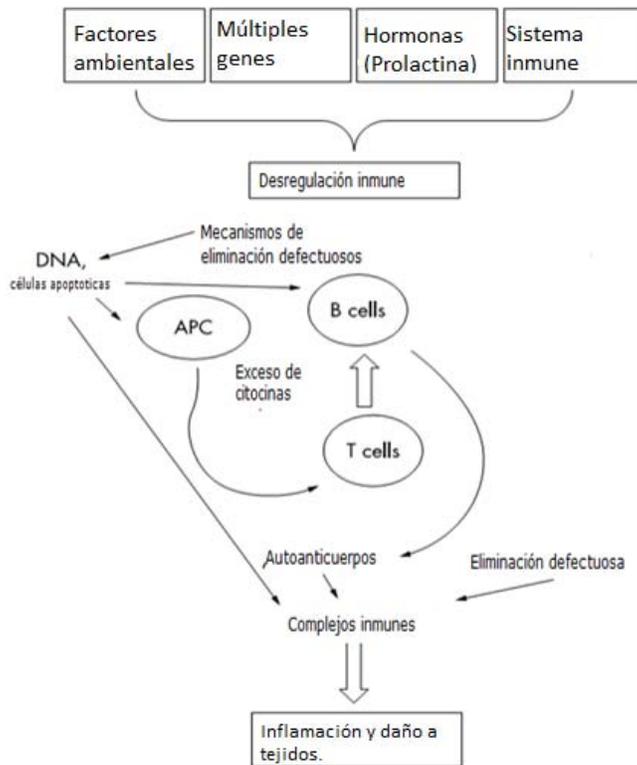
Por otro lado, en la enfermedad inflamatoria intestinal se ha reportado que los pacientes presentan un incremento en células Th17 y Th1/Th17 en el intestino comparadas con controles normales. Estas células de memoria expresan CCR4, CCR5, CCR6 e IL-23R. Otra enfermedad autoinmune que ha sido recientemente relacionada a una inapropiada respuesta de las células Th17 es el lupus eritematoso sistémico (LES), en donde los niveles séricos de IL-17, IL-23 y el número de células Th17 son mayores en pacientes que en individuos sanos (González y col., 2009; Martínez y col., 2008).

### **Lupus Eritematoso Sistémico**

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad crónica autoinmune de etiología desconocida que puede afectar prácticamente cualquier órgano o sistema del organismo (Mok y Lau, 2003), 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 (figura 4) (Bertsias y col., 2012; Grammer y Lipsky, 2003; Petri, 2008). El LES afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer:hombre de 9:1) en edad reproductiva, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmuno-estimuladoras de las hormonas sexuales como los estrógenos, los andrógenos y la prolactina en la predisposición de la enfermedad (Bertsias y col., 2012; Mok y Lau, 2003).

Los pacientes con LES presentan defectos en los mecanismos de tolerancia dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B. Estos linfocitos presentan anomalías en su activación, producción de citocinas y diferenciación a células de memoria. Los linfocitos T CD4 auto-reactivos cooperan a través de sus moléculas co-estimuladoras y secreción de citocinas con los linfocitos B auto-reactivos para la producción de auto-anticuerpos dirigidos contra diversas moléculas del núcleo como el DNA, RNA, 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. Además, la eliminación de complejos inmunes y células apoptóticas es defectuosa en pacientes con LES favoreciendo una inflamación crónica (Bertsias y col., 2012; Grammer y Lipsky, 2003, Lipsky, 2001; Mok y Lau, 2003).

Para entender los aspectos relevantes de la patogenia de LES se han empleado distintas cepas de ratones. Estas cepas son, NZBxNZW F<sub>1</sub>, BXSB, MRL y MRL-FAS<sup>lpr</sup> (MRL/lpr), que tienen la característica de desarrollar espontáneamente una enfermedad semejante a lupus en humanos (Andrews y col., 1978; Furukawa y Yoshimasu, 2005). La cepa MRL/lpr tiene una mutación en la molécula FAS y se caracteriza por presentar glomerulonefritis, depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergammaglobulinemia y producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente dirigidos contra DNA de doble cadena (dsDNA). Estas manifestaciones de la enfermedad comienzan 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 (Adachi y col., 1996; Perry, 2011; Watanabe y col., 1992).



**Figura 4. La patogénesis del LES.** Factores ambientales, genéticos, hormonales e inmunológicos pueden desencadenar una desregulación de la respuesta inmune que favorecen el desarrollo de LES. La presencia de clonas auto-reactivas de células T y B que favorecen la producción de auto-anticuerpos y la formación de complejos inmunes causan inflamación y daño tisular (modificada de Mok y Lau, 2003).

### Lupus Eritematoso Sistémico y células Th17

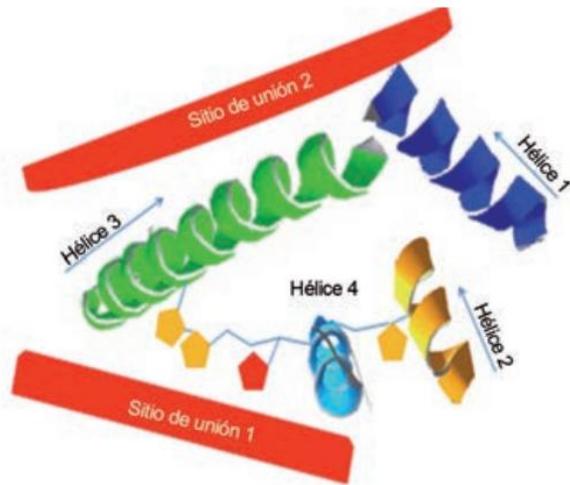
En LES, las células T CD4+ auto-reactivas cooperan con las células B para la producción de auto-anticuerpos a través de señales co-estimuladoras y secreción de citocinas (Shah y col., 2010). Se ha demostrado que IL-17 sola o en combinación con BAFF promueve la supervivencia de las células B y su diferenciación a células productoras de anticuerpos, lo cual podría sugerir que IL-17 está implicada en la patogénesis de la enfermedad, promoviendo la inmunidad humoral contra auto-antígenos (Shah y col., 2010; Shin y col., 2011; Nalbandian y col., 2009). Tanto en humanos como en modelos de ratón de LES, existe evidencia del papel de las células Th17 en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad (Hirota y col., 2010; Shin y col., 2011; Perry y col., 2011). Se ha reportado que pacientes con LES presentan elevadas concentraciones de IL-17 en suero, con una frecuencia incrementada de células T productoras de IL-17 en sangre periférica, además de infiltración de células Th17 en órganos blanco como los riñones (Alunno y col., 2012; Nalbandian y col., 2009; Pernis, 2009; Shah y col., 2010; Shin y col., 2011). Resultados similares han sido reportados en ratones que desarrollan lupus como MRL/lpr y SNF1 (Nalbandian y col., 2009; Shin y col., 2011), además se ha observado que al bloquear IL-17 se disminuyen las manifestaciones de la enfermedad

(Nalbandian y col., 2009; Pernis, 2009). El ambiente de citocinas que favorecen la diferenciación a células Th17 son facilitadas en personas con LES debido a que los niveles de IL-6 e IL-21 se encuentran elevados en estos pacientes (Nalbandian y col., 2009). Algunos estudios han mostrado que los niveles de IL-17 correlacionan con la actividad de la enfermedad y están asociados al daño renal (Alunno y col., 2012). Además, la fosforilación de STAT-3 esta incrementada en los pacientes con LES (Perry y col., 2011).

En ratones MRL/lpr se ha observado que la deficiencia de IL-17 disminuye el daño en lesiones inducidas por la isquemia (Nalbandian y col., 2009). Además, recientemente se ha demostrado que IL-17 es crítica para la formación de centros germinales auto-reactivos en ratones BXD2, una cepa que desarrolla LES (Pernis, 2009), demostrando la importancia de IL-17 en la patogenia de LES (Alunno y col., 2012).

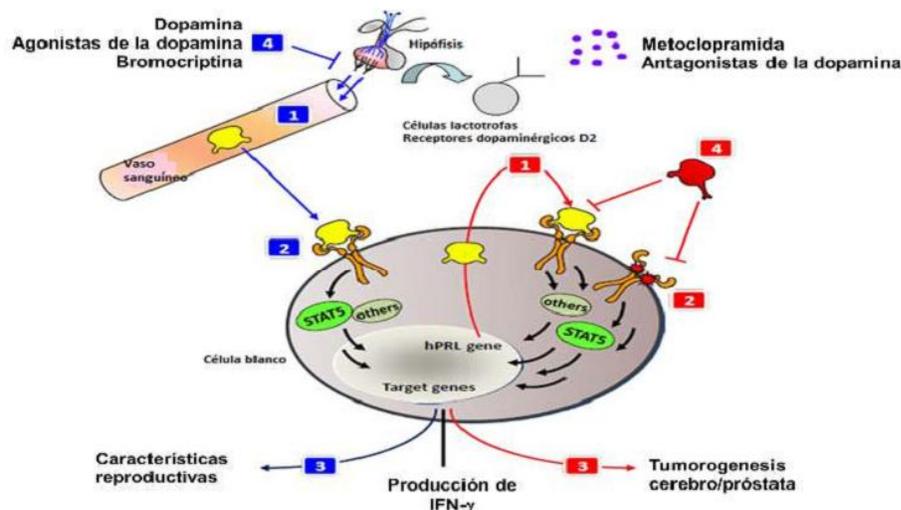
### **Prolactina y su receptor**

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por células de la hipófisis anterior (lactotropos), de forma extra-hipofisiaria por endometrio, médula ósea, bazo, células epiteliales mamarias, linfocitos T y B entre otros (Bernichtein y col., 2010; Blanco y col., 2012; Bole y col., 1998; Bouchard y col., 1999; Chávez y col., 2005). Es una proteína globular de una sola cadena con 199 aminoácidos formada por 4  $\alpha$ -hélices, tres puentes disulfuro intra-moleculares y dos sitios de unión al receptor de PRL (figura 5). Aunque la principal forma de PRL que se ha encontrado en hipófisis y suero tiene un peso molecular de 23 kDa, se han descrito distintas isoformas que resultan de modificaciones post-transcripcionales, post-traduccionales o modificaciones químicas en su cadena de aminoácidos, la glucosilada (25 kDa), que presenta una menor actividad biológica; la macroprolactina (big-big PRL >100 kDa) y la big PRL (40-60 kDa), dos isoformas de alto peso molecular que surgen de la dimerización o polimerización de la misma o de la unión con otras proteínas, como anticuerpos (150 kDa) y la de 16 kDa (potente factor angioplítico), producto de la degradación enzimática de la PRL de 23 kDa (Ben y col., 2008; Freeman y col., 2000; Leaños y col., 2006).



**Figura 5. Estructura terciaria de la prolactina.** La PRL presenta cuatro dominios alfa-hélice y dos sitios de unión al receptor (Blanco y col., 2012).

La liberación de PRL es regulada por varias hormonas y neuropéptidos producidos en el hipotálamo, como la serotonina, la hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, mediadores inflamatorios como bradiquininas, colecistoquininas, angiotensina II, histamina y factor activador plaquetario, así como algunos fármacos como domperidona y metoclopramida. Citocinas como IL-6 e IL-1 estimulan su liberación y la dopamina y sus agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina inhiben su liberación (figura 6), (Ignacak y col., 2012; Molina y col., 1995).

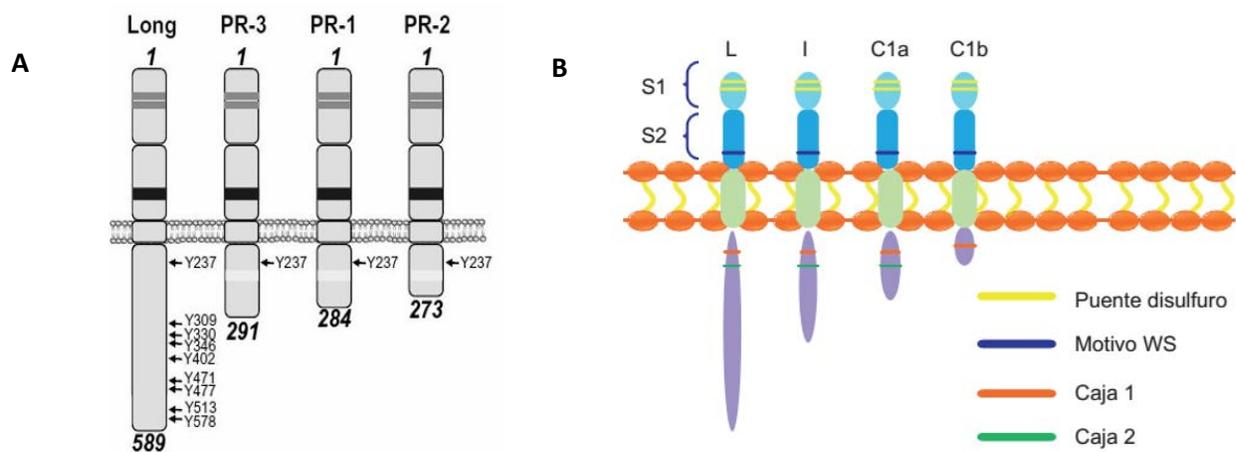


**Figura 6. Secreción de prolactina por metoclopramida.** La metoclopramida actúa sobre las células lactotrofas de las hipófisis bloqueando los receptores dopaminérgicos D2 e induce la liberación de PRL, la cual llega a las células que expresan el receptor de PRL para ejercer su efecto (modificada de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

Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales pueden agruparse en cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) desarrollo y crecimiento, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunorregulación. Sus efectos sobre la reproducción, el crecimiento y la osmorregulación constituyen sus principales funciones, sin embargo en los últimos años se ha demostrado que también actúa como inmunomodulador, ejerciendo un papel importante en la respuesta de células B y T tanto *in vivo* como *in vitro*. Los efectos biológicos de la PRL son mediados por la interacción con su receptor (Blanco y col., 2012; Freeman y col., 2000).

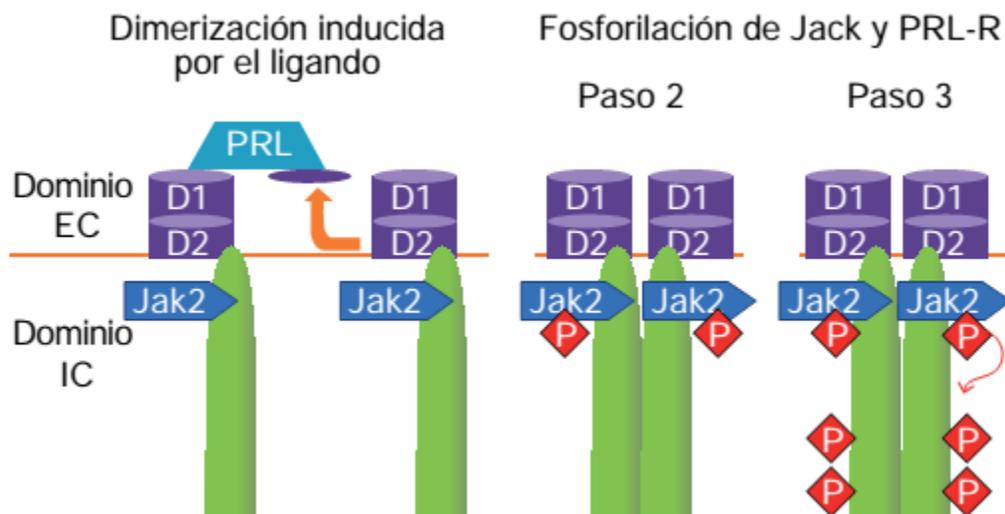
El receptor de PRL es una proteína transmembranal que pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I y está distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B (Ben y col., 2008; Bole y col., 1998; Gagnerault y col., 1993; Ledesma y col., 2012).

Su gen en el humano se encuentra en el cromosoma 5 y codifica para tres diferentes isoformas, una corta, intermedia y larga (figura 7B). En el ratón el gen del receptor de PRL se localiza en el cromosoma 15 y se conocen 4 isoformas, una larga y 3 cortas (figura 7A). Estas isoformas exhiben un dominio extracelular y transmembranal idéntico, mientras que el dominio intracelular presenta diferentes tamaños y composiciones, dependiendo de la isoforma del receptor. Las isoformas corta y larga del receptor se expresan de manera diferencial en distintos tejidos, sugiriendo efectos y activación de rutas de señalización diferentes. La isoforma larga es la más frecuente en el humano (Clevenger y col., 1998; Binart y col., 2010).



**Figura 7. Receptor de prolactina e isoformas.** **A.** Isoformas larga y cortas descritas en ratón. **B.** Isoforma larga, intermedia y cortas en humano. (Blanco y col., 2012; Freeman y col., 2000).

El evento inicial de la señalización ocurre cuando una molécula de PRL se une a dos monómeros del receptor de PRL para inducir su dimerización y subsecuente activación. La unión de la PRL con su receptor induce la fosforilación de tirosinas (Tyr) de distintas proteínas intracelulares. La región intracelular próxima a la membrana se encuentra constitutivamente asociada a JAK2, que se fosforila después de la interacción PRL–receptor con la consecuente activación de diferentes vías de señalización como JAK2/STAT y/o MAPK. Las acciones pleiotrópicas de la PRL relacionadas con proliferación celular, diferenciación, apoptosis o supervivencia celular dependen de las interacciones entre estas cascadas paralelas de cinasas (figura 8), (Binart y col., 2010; Blanco y col., 2012; Bole y col., 1998; Bouchard y col., 1999).



**Figura 8. Mecanismo de activación del receptor de prolactina por dimerización inducida por prolactina.** Una molécula de PRL se une a dos monómeros del receptor de PRL para inducir su dimerización y subsecuente activación. La región intracelular próxima a la membrana se encuentra constitutivamente asociada a JAK2, que se fosforila después de la interacción PRL–receptor de PRL con la consecuente activación de diferentes vías de señalización como JAK2/STAT y/o MAPK (Blanco y col., 2012).

### Prolactina y sistema inmune

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), (Nagy y col. 1983).

Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL a través de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  que actúan como reguladores parácrinos o endócrinos en la liberación o inhibición de PRL hipofisiaria (De Laurentiis y col., 2002; Spangelo y col., 2000).

Distintos reportes muestran la importancia de la PRL en el sistema inmune. La PRL es capaz de inducir proliferación y diferenciación de los precursores de los linfocitos T. La estimulación *in vitro* con PRL regula el proceso de maduración (ontogenia) de timocitos dobles negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) a dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2 (Carreño y col., 2005); la PRL incrementa la adhesión de las células mononucleadas con las epiteliales y participa en la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 (Montes de Oca y col., 2005). Interviene en la expresión de las moléculas CD69 y CD154 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ya que al activarlos con PMA e incubarlos con anticuerpos anti-PRL, la expresión de estas moléculas disminuye (Chávez y col., 2005). Así mismo, la expresión de CD69 y CD25 en linfocitos CD8<sup>+</sup> aumenta al co-incubarse con PRL y fitohemaglutinina (Takizawa y col., 2005). La PRL también interviene en la secreción de citocinas, los linfocitos T activados con PMA e incubados con anticuerpo anti-PRL presentan una disminución en la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Chávez y col., 2005), mientras que las células mononucleadas activadas con LPS más PRL incrementan la secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$  (Brand y col., 2004). De igual forma, las citocinas afectan la expresión del RNA mensajero (mRNA) de PRL en linfocitos T, la IL-4 e IL-1 $\beta$  reducen su expresión (Gerlo y col., 2005). En células dendríticas de rata la PRL estimula su diferenciación e incrementa la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), (Carreño y col., 2004). Además se ha demostrado que la expresión del receptor de la PRL es constitutiva en las células T reguladoras, a diferencia de las células T efectoras, que requieren del estímulo anti-CD3/CD28 para inducir la expresión de dicho receptor. También se ha demostrado que la PRL inhibe la función de células T reguladoras, aparentemente a través de la inducción de un perfil de secreción de citocinas tipo Th1 (Legorreta y col., 2012).

### **Prolactina y Lupus Eritematoso Sistémico**

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

La inducción de hiperprolactinemia crónica en ratas estimula respuestas primarias humorales de anticuerpos y acelera el fenómeno autoinmune en ratones propensos a lupus (Mok y Lau, 2003). En ratones NZB/NZW se ha reportado que la hiperprolactinemia exagera 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). También se ha observado que en ratones MRL/lpr y MRL la inducción de hiperprolactinemia con metoclopramida exagera la enfermedad (Ledesma y col., 2012). En ratones BALB/c R4A- $\gamma$ 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 (Saha y col., 2011; Peeva y col., 2003).

## **JUSTIFICACIÓN**

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, se caracteriza por la presencia de clonas auto-reactivas y la producción de auto-anticuerpos que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva, LES tiende a presentarse o exacerbarse durante el embarazo o en el periodo post-parto, condiciones que se acompañan de niveles elevados de hormonas, entre ellas la prolactina (PRL). El uso de modelos de ratón (NZB/NZW, MRL, MRL/lpr) que desarrollan una enfermedad semejante a lupus en el humano, han permitido entender mejor la patología de esta enfermedad. En estos ratones se ha demostrado que el estado de hiperprolactinemia exagera la actividad de la enfermedad al igual que en pacientes con LES.

Por otro lado, se ha reportado que tanto en pacientes con LES como en ratones MRL/lpr los niveles séricos de IL-17 se encuentran elevados así como la frecuencia de células Th17, células que aunque son importantes en la inmunidad contra bacterias y hongos, se ha demostrado que juegan un papel central en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como en LES.

Se sabe que tanto en pacientes con LES como en ratones que desarrollan lupus (MRL/lpr) los niveles séricos de IL-17 se encuentran elevados así como los de PRL, además ambos niveles correlacionan con la exacerbación de la enfermedad, por lo que resulta interesante investigar si la PRL favorece la diferenciación de células Th17 en ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus, para lo cual primero es importante determinar si las células Th17 expresan el receptor de PRL.

## **HIPÓTESIS**

El receptor de prolactina se expresará en los linfocitos Th17 y esta expresión será mayor en las células de ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión del receptor de prolactina en linfocitos Th17 de ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

En las tres cepas de ratones (C57-BL/6, MRL y MRL/lpr):

1. Determinar los niveles séricos de IL-17 y prolactina en ratones con o sin hiperprolactinemia.
2. Purificar linfocitos T CD4 "naive" (CD4+CD62L+) de bazo y promover su diferenciación a linfocitos Th17 *in vitro*.
3. Determinar la expresión del receptor de prolactina en células Th17.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratones hembras 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<sup>lpr</sup> (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 la 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 o el medio ambiente.

### **Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti CD4-FITC (clona RM4-5), anti CD62L-PE (clona MEL-14), anti ROR $\gamma$ t-PE (clona B2D) y anti CD25-APC (clona PC61) de eBioscience, USA, anti-receptor de PRL policlonal producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-IgG de cabra biotinilado producido en cerdo (Invitrogen, USA), el anticuerpo biotinilado fue detectado con estreptavidina brillante violeta 421 (BioLegend, USA). Anticuerpo anti-CD3e de ratón (clona 145-2C11) de eBioscience, USA. Anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (clona 37895) y anti-IL-4 (clona 30340) de R&D, USA.

### **Hormona (Prolactina)**

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

## **Citocinas**

IL-6 y TGF- $\beta$  1, ambas recombinantes de ratón (R&D, USA).

## **Fármaco**

Se empleó metoclopramida como inductor de hiperprolactinemia (Sigma Aldrich, USA).

## **Inducción de hiperprolactinemia**

Se indujo un estado de hiperprolactinemia en las diferentes cepas de ratón de la siguiente manera: se formaron dos grupos (6 hembras por grupo) por cada cepa de ratón, los tratamientos fueron: I) 100 $\mu$ L de PBS y II) 100 $\mu$ L de metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 2mg/mL disuelta en PBS. La administración del tratamiento se realizó durante 6 semanas por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre al inicio y al término del tratamiento para determinar concentraciones séricas de PRL, anticuerpos anti-dsDNA e IL-17. También se midió proteinuria al inicio y al término del tratamiento.

## **Verificación de la inducción de hiperprolactinemia**

La inducción de hiperprolactinemia en las diferentes cepas de ratones tratados (con PBS y metoclopramida) y no tratados se verificó midiendo las concentraciones séricas de PRL por ELISA.

## **ELISA para prolactina**

Se sensibilizó la placa de 96 pozos (Nunc, USA) con 100 $\mu$ L del anticuerpo anti-PRL de ratón (R&D Systems, USA) a una concentración de 2 $\mu$ g/mL, se incubó durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C. Se bloqueó la placa (PBS-Tween-BSA 2%) y se incubó una hora a 37 $^{\circ}$ C. Se lavó (PBS-Tween), se adicionó el estándar de PRL (10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL y 0ng/mL) y los sueros problema a una dilución 1:3. Se incubó toda la noche a 4 $^{\circ}$ C y una hora a 37 $^{\circ}$ C. Se lavó y se adicionó el anticuerpo anti-PRL biotinilado (R&D Systems) a una concentración de 0.2mg/mL. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente, se lavó y se adicionó la avidina-AP (fosfatasa alcalina) a una dilución 1:1000. Finalmente se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionó el sustrato de la fosfatasa alcalina (Sigma, USA). La placa

se leyó en un lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 405nm en intervalos de 15 minutos por una hora.

### **Determinación de proteinuria**

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

### **ELISA para anticuerpos IgG anti ds-DNA**

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

### **Cuantificación de IL-17 mediante CBA**

La determinación de IL-17 se realizó utilizando el kit comercial de CBA (BD Biosciences, USA). Brevemente se utilizaron 17µL de muestra o de los estándares para la curva de concentración (1250µg/mL, 625µg/mL, 312.5µg/mL, 156µg/mL, 80µg/mL, 40µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL, 0µg/mL), se adicionaron 17µL de perlas de captura, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, se agregó 17µL de la mezcla de anticuerpos anti-IL-17 conjugados a PE e incubó 1 hora a temperatura ambiente, se agregó 200µL del regulador de lavado y se centrifugó a 1500rpm por 5min. El sobrenadante fue aspirado y las muestras fueron leídas en el citómetro MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, USA).

### **Obtención de células de bazo**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se obtuvo el bazo y se colocó en 5mL de medio RPMI frío (Thermo Scientific, USA). Se inyectaron 5mL de solución salina isotónica

(Laboratorios PISA, México) al bazo y se maceró sobre un colador de nylon 70µm (BD Biosciences, USA). Los eritrocitos se lisaron al incubar con 2mL de regulador de lisis (Sigma Aldrich, USA) por 2 minutos, las células se lavaron con solución salina fría (aprox. 50mL), centrifugaron (1200rpm, 10min) y contaron con azul tripano (BioWhittaker, USA) en la cámara de Neubauer para determinar viabilidad.

### **Tinción de receptor de PRL**

Las células obtenidas del bazo ( $1 \times 10^6$ ) se tiñeron con 15µL de anticuerpo anti receptor de PRL, 50µL de una dilución 2:250 de un segundo anticuerpo anti-cabra biotinilado y 50µL de una dilución 1:1000 de estreptavidina brillante violeta 421. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo no relacionado de cabra (suero de cabra). Además se tiñeron también con anticuerpos anti-CD4 FITC, anti-CD62L PE y anti-CD25 APC. Las células se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con los distintos anticuerpos, se lavaron con FACS (1500rpm, 5min), se fijaron con paraformaldehído al 2% (5 minutos a 4°C en oscuridad) y lavaron nuevamente. Se leyeron en el citómetro MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, USA) y analizaron con el programa FlowJo software v10 (Tree Star Ashland, USA).

### **Purificación de células T CD4 “naive” de bazo**

Las células de bazo se purificaron con un Kit de Miltenyi Biotec (USA). Para esto, se incubaron con una mezcla de diferentes anticuerpos biotinilados excepto anti-CD4 (10min, 4°C), se incubaron con anticuerpos anti-biotina conjugado a perlas magnéticas (15min, 4°C), se lavaron (1200rpm, 10min) y pasaron por una columna magnética LS (Miltenyi Biotec, USA) y por selección negativa se purificaron a los linfocitos CD4+, los cuales se incubaron con anticuerpos anti-CD62L unidos a perlas magnéticas (15min, 4°C), se lavaron y pasaron por una columna MS (Miltenyi Biotec, USA) y por selección positiva se purificaron a los linfocitos T CD4 “naive” (CD4+CD62L+).

### **Citometría de flujo**

Para verificar la pureza de las células T CD4 “naive”, éstas se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4 FITC y anti-CD62L PE, se incubaron 20min a 4°C en oscuridad y se lavaron con regulador FACS (1500rpm, 5min), se fijaron con paraformaldehído al 2%, se lavaron y leyeron en el citómetro MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, USA).

### **Diferenciación de células T CD4 “naive” a Th17**

Las células T CD4 “naive” purificadas fueron cultivadas a 37°C por 2 días en una microplaca para cultivo celular (Nunclon™ Δ Surface, Denmark) por triplicado en 3 diferentes condiciones, 1) en medio AIMV (Invitrogen, USA) suplementado, 2) en medio AIMV suplementado con un cóctel de citocinas y anticuerpos compuesto de IL-6 a una concentración final de 40ng/mL, TGF-β a 10ng/mL, anti-CD3 a 5μg/mL, anti-IFN-γ a 10μg/mL y anti-IL-4 a 10μg/mL, 3) en medio AIMV suplementado, el cóctel (citocinas y anticuerpos) y PRL a una concentración final de 50ng/mL.

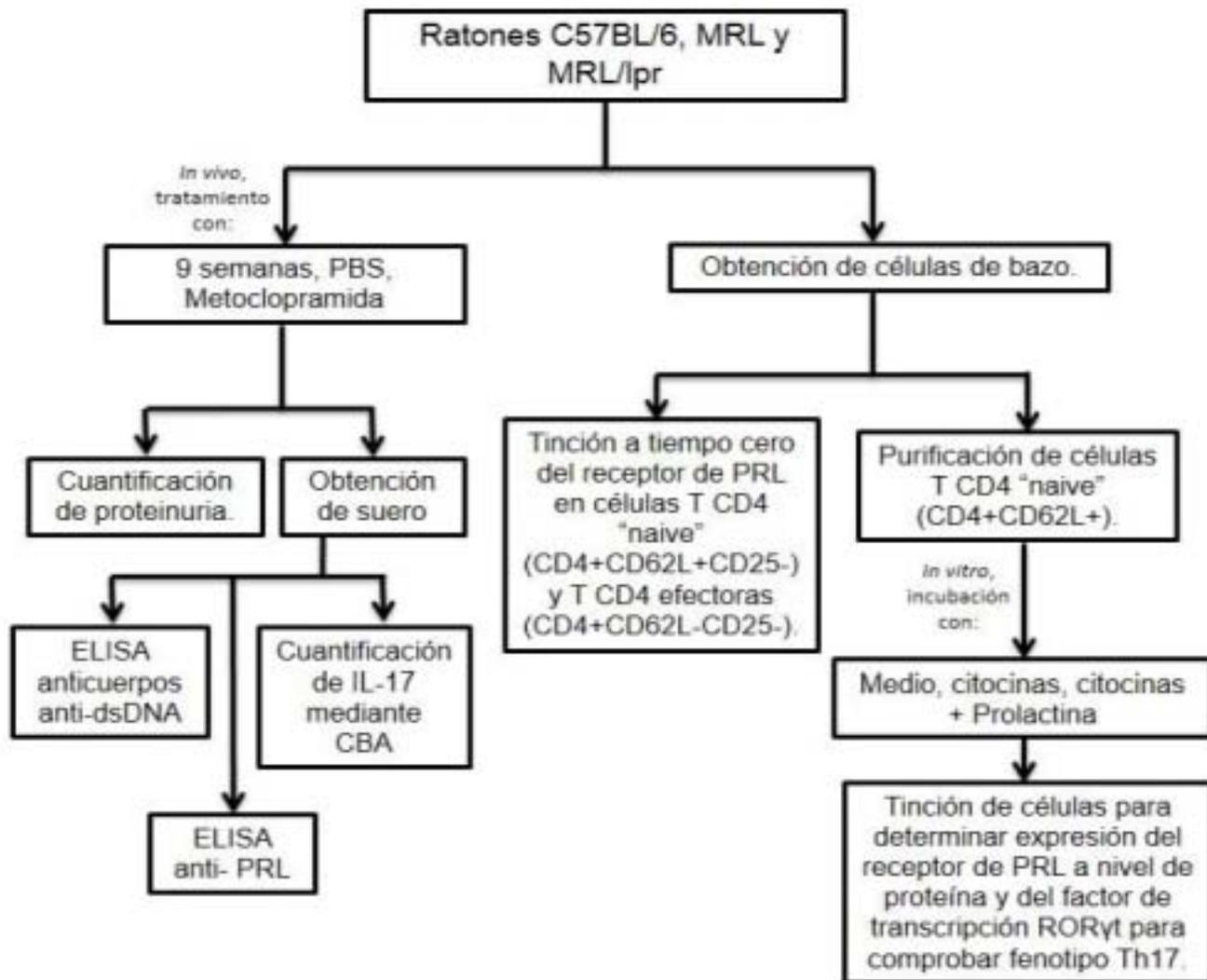
### **Tinción del receptor de PRL y del factor de transcripción RORγt**

Las células T CD4 previamente incubadas se tiñeron con 15μL de anticuerpo anti receptor de PRL, un segundo anticuerpo anti-cabra biotinilado y estreptavidina brillante violeta 421. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo no relacionado de cabra (suero de cabra). Las células se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con los distintos anticuerpos, se lavaron con FACS (1500rpm, 5min), se fijaron con paraformaldehído al 2% (5 minutos a 4°C en oscuridad) y lavaron. Para la tinción intracelular se utilizó el Kit FOXP3 Staining Buffer Set (Ebioscience, USA). La células se permeabilizaron durante 18h a 4°C, se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-RORγt PE (30min, 4°C en oscuridad). Se lavaron dos veces con el buffer de lavados (2000rpm, 3min) y una vez con regulador FACS. Finalmente se leyeron en el citómetro MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, USA).

### **Análisis estadístico**

Utilizando la prueba normalidad Shapiro Wilk se determinó la distribución de los datos y se reportó el promedio y la desviación estándar. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de t de Student. Las diferencias entre grupos se determinaron utilizando la prueba ANOVA. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de computo SPSS 19.

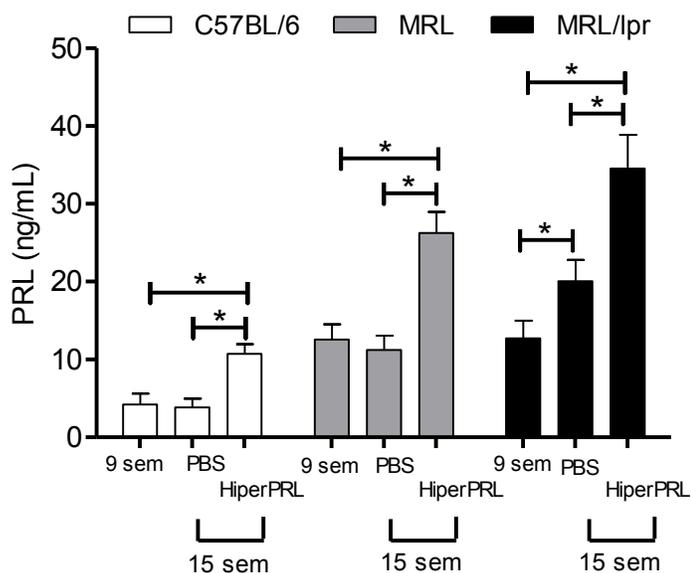
# DIAGRAMA DE FLUJO



## RESULTADOS

### Manifestación de LES en ratones con hiperprolactinemia

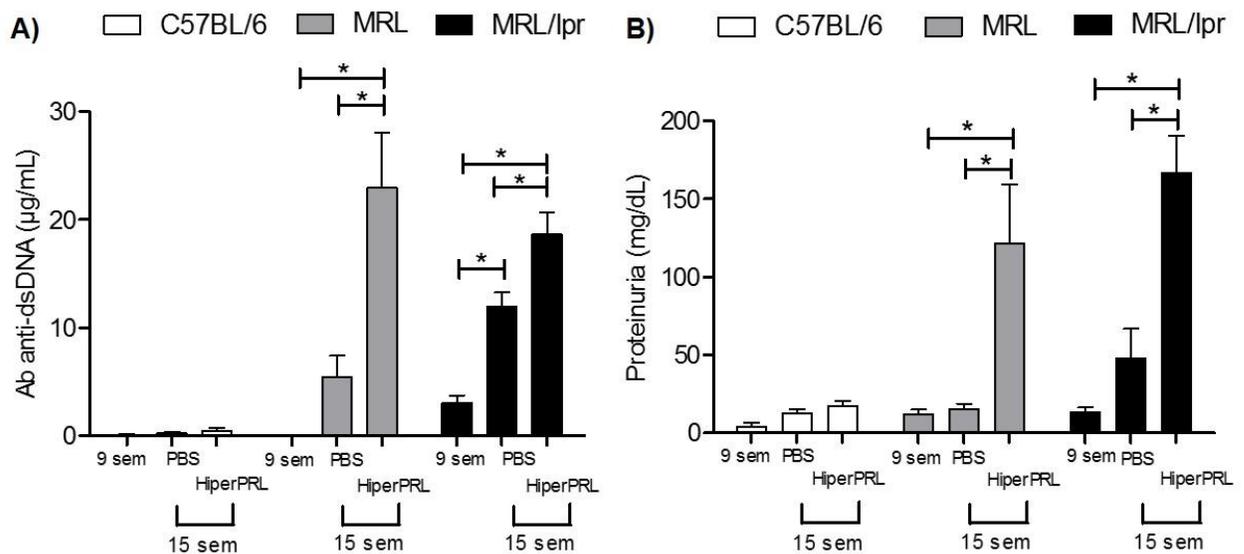
Ratones C57BL/6, MRL y MRL/lpr de 9 semanas fueron tratados con metoclopramida por 6 semanas para inducir niveles elevados de PRL y evaluar las manifestaciones de la enfermedad. Las concentraciones de PRL en suero antes y después del tratamiento fueron las siguientes: C57BL/6,  $4.2 \pm 1.38$  ng/mL (9 semanas),  $3.80 \pm 1.18$  ng/mL (PBS) y  $10.70 \pm 1.23$  ng/mL (metoclopramida); MRL,  $12.58 \pm 1.99$  ng/mL,  $11.20 \pm 1.81$  ng/mL y  $26.27 \pm 2.69$  ng/mL y MRL/lpr,  $12.73 \pm 2.25$  ng/mL,  $20.07 \pm 2.75$  ng/mL y  $34.51 \pm 4.34$  ng/mL (figura 9). Todas las cepas presentaron incrementos estadísticamente significativos en la concentración sérica de PRL (hiperprolactinemia) en respuesta a la metoclopramida, mientras que solo la cepa MRL/lpr presentó un incremento estadísticamente significativo con PBS (15 semanas al final del tratamiento).



**Figura 9. Inducción de hiperprolactinemia.** Los ratones de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL de 9 semanas de edad fueron tratados con metoclopramida y PBS por 6 semanas. Al inicio (9 semanas de edad) y al final del tratamiento (15 semanas de edad) se determinó la concentración de PRL por ELISA (\* $p < 0.05$ ).

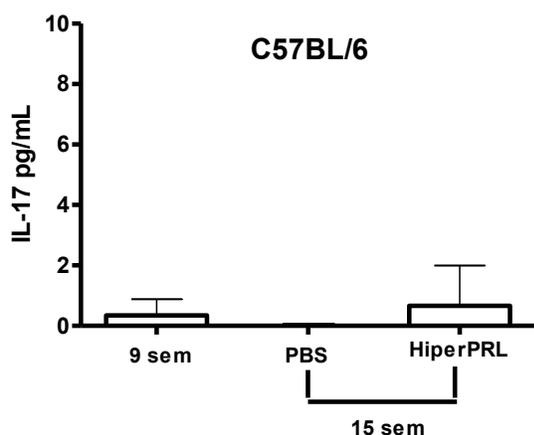
Las manifestaciones de la enfermedad se evaluaron a través de la determinación de la concentración de anticuerpos anti-dsDNA en suero y proteinuria, antes y después del

tratamiento. Las concentraciones séricas de auto-anticuerpos anti-dsDNA se comenzaron a detectar en los ratones MRL tratados con PBS ( $5.94 \pm 1.98\mu\text{g/mL}$  [15 semanas de edad]), sin embargo, estas concentraciones incrementaron 4 veces ( $22.96 \pm 5.11\mu\text{g/mL}$ ) cuando se les indujo hiperprolactinemia con metoclopramida. El mismo comportamiento se observó en la cepa MRL/lpr, las concentraciones séricas de auto-anticuerpos se elevaron en los ratones con hiperprolactinemia, en comparación con los tratados con PBS ( $22.50 \pm 5.10\mu\text{g/mL}$  [hiperprolactinemia] y  $11.60 \pm 1.20\mu\text{g/mL}$  [PBS]) (figura 10A). Los niveles de proteinuria se incrementaron con una diferencia estadísticamente significativa en respuesta a la metoclopramida en los ratones que desarrollan lupus, solo la cepa MRL/lpr mostró un incremento estadísticamente significativo con el tratamiento con PBS, lo cual correlacionó con el incremento de PRL en suero (figura 10B). Los ratones C57BL/6 no presentaron ni proteinuria ni anticuerpos anti-dsDNA cuando se les indujo un estado de hiperprolactinemia.

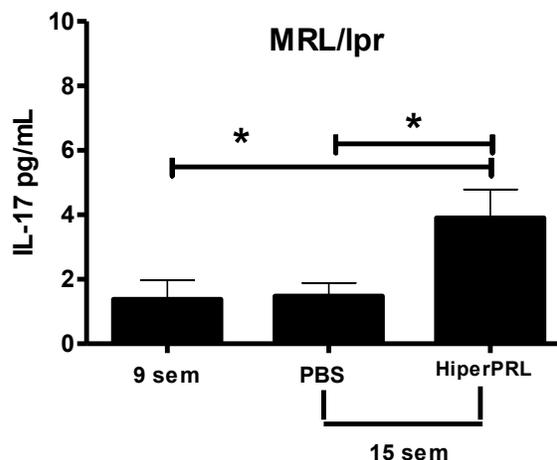
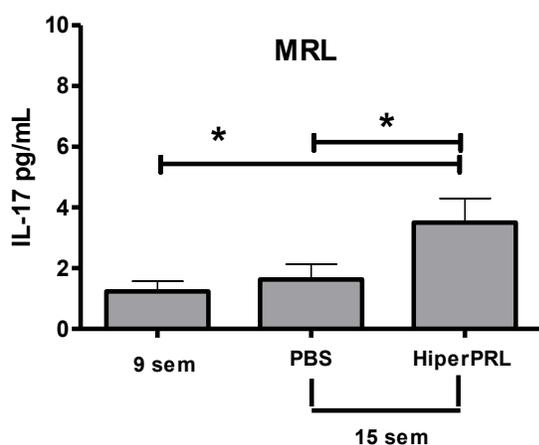


**Figura 10. Manifestaciones de LES en ratones con hiperprolactinemia.** Los ratones de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL de 9 semanas de edad fueron tratados durante 6 semanas con PBS o con metoclopramida (hiperprolactinemia), se les determinó: **A)** Concentración de anticuerpos IgG anti-dsDNA por ELISA, **B)** Niveles de proteinuria usando tiras reactivas. (\* $p < 0.05$ ).

En cuanto a las concentraciones séricas de IL-17 se observó que solamente en los ratones MRL ( $1.23 \pm 0.33$ pg/mL [9 semanas],  $1.74 \pm 0.44$ pg/mL [PBS],  $3.51 \pm 0.78$ pg/mL [hiperprolactinemia]) y MRL/lpr ( $1.38 \pm 0.60$ pg/mL,  $1.48 \pm 0.14$ pg/mL,  $3.90 \pm 0.89$ pg/mL) el estado de hiperprolactinemia incrementó los niveles séricos de IL-17 con una diferencia estadísticamente significativa. En la cepa control (C57BL/6) no se encontró incremento en los niveles séricos de IL-17 en ningún tratamiento (Figura 11).

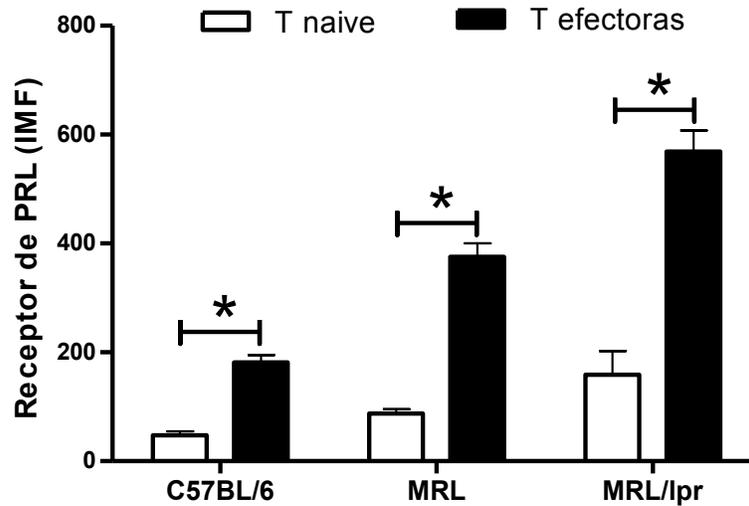


**Figura 11. Niveles séricos de IL-17.** Los ratones de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL de 9 semanas de edad fueron tratados durante 6 semanas con PBS o con metoclopramida (hiperprolactinemia), al final del tratamiento se les determinó niveles séricos de IL-17 mediante CBA (\* $p < 0.05$ ).



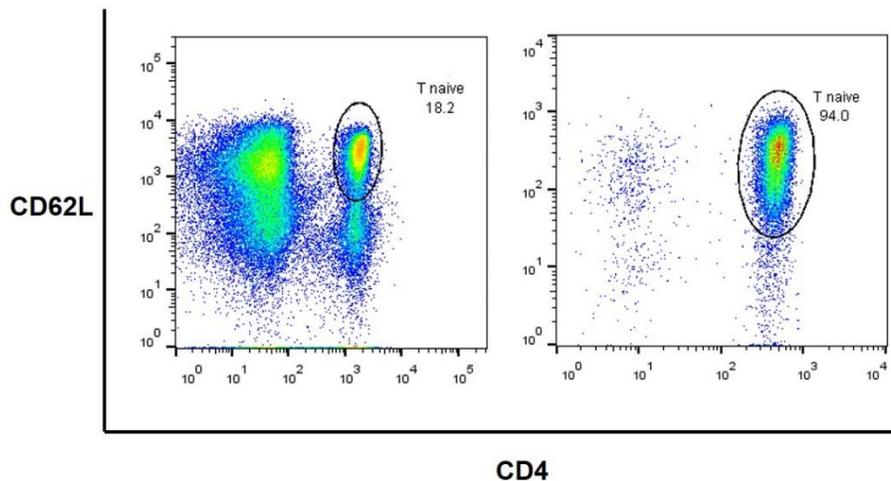
Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de PRL en la células T CD4 “naive” ( $CD4+CD62L+CD25^-$ ) y las células T efectoras ( $CD4+CD62L-CD25^-$ ). Como se observa en la figura 12 en las tres cepas de ratones las células T efectoras (C57BL/6 [ $181.50 \pm 13.44$ ], MRL [ $375.67 \pm 24.95$ ] y MRL/lpr [ $569.00 \pm 38.97$ ]) expresaron mayor receptor de PRL comparado con las células T CD4 “naive” (C57BL/6 [ $47.50 \pm 7.78$ ], MRL [ $87.67 \pm 7.77$ ] y MRL/lpr [ $159.00 \pm 43.58$ ]). Comparando entre las diferentes cepas se

encontró que es mayor la expresión del receptor de PRL tanto en las células T CD4 “naive” como efectoras provenientes de los ratones que desarrollan LES (MRL y MRL/lpr).



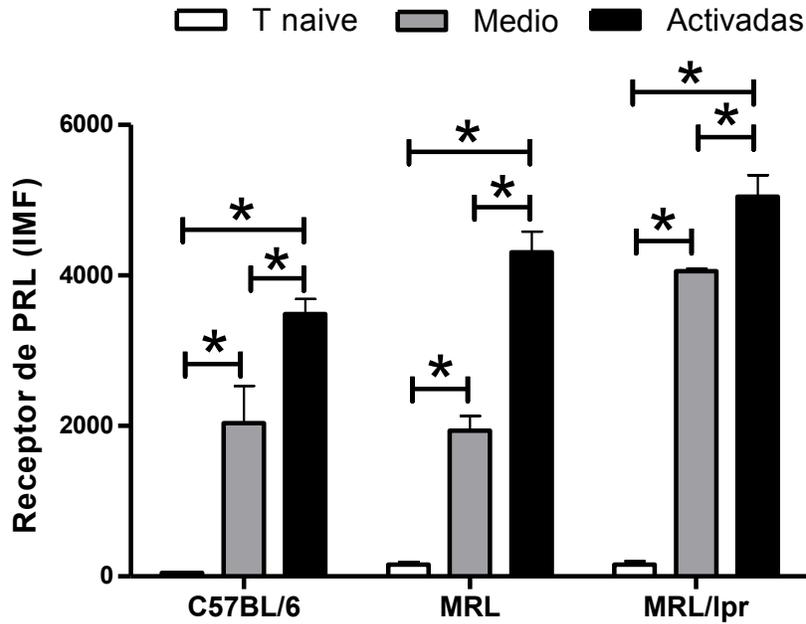
**Figura 12. Expresión del receptor de prolactina en células T CD4 “naive” y T efectoras.** Se midió la expresión del receptor de PRL (IMF) en células T CD4 “naive” y T efectoras extraídas de bazo de ratones de las cepas C57BL/6, MRL y MRL/lpr de 9 semanas de edad (\* $p < 0.05$ ).

Las células T CD4 “naive” se purificaron mediante columnas magnéticas obteniendo purezas mayores del 90% como se muestra en la figura 13.



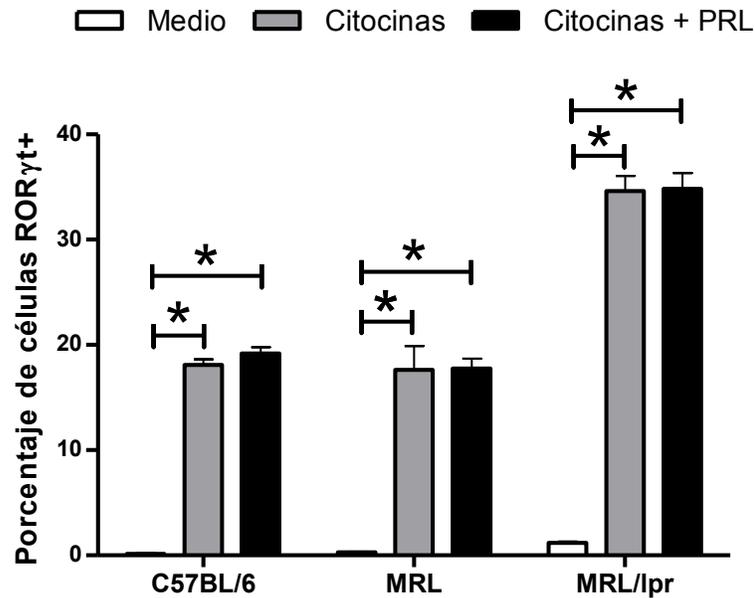
**Figura 13. Purificación de células T CD4 “naive”.** Células provenientes de bazo de ratón antes y después de la purificación. Las células T CD4 “naive” (CD4+CD62L+) se purificaron con un Kit y columnas magnéticas de Miltenyi Biotec (USA) mediante dos selecciones, la primera negativa donde se obtuvieron los linfocitos T CD4+ y la segunda positiva donde se obtuvieron los linfocitos T CD4+CD62L+ (“naive”) con una pureza del 94%.

Las células T CD4 “naive”, se incubaron en diferentes condiciones; i) medio, ii) anti-CD3, TGF- $\beta$ , IL-6, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4 (células activadas). En estas células se determinó la expresión del receptor de PRL, los resultados mostraron que la expresión del receptor fue mayor en las células activadas (C57BL/6 [3487.33 $\pm$ 346.40], MRL [4309.33 $\pm$ 473.46], MRL/lpr [5049.50 $\pm$ 692.26]) seguida de las células incubadas con medio (C57BL/6 [2038.00 $\pm$ 496.02], MRL [1935.33 $\pm$ 197.88], MRL/lpr [4057.00 $\pm$ 28.28]), siendo las células T CD4 “naive” las que menor expresión presentaron (C57BL/6 [47.50 $\pm$ 7.78], MRL [159.67 $\pm$ 32.04] y MRL/lpr [159.00 $\pm$ 43.58]), (figura 14).



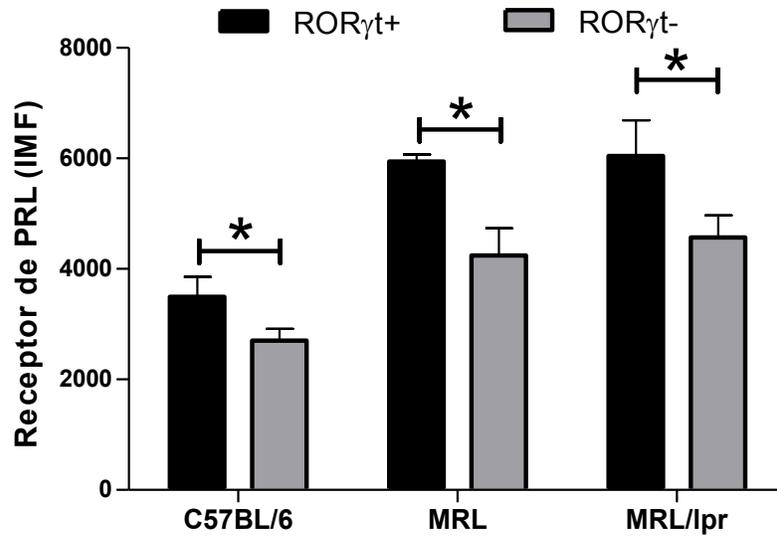
**Figura 14. Expresión del receptor de prolactina en células T CD4 “naive” y en células T CD4+ incubadas con medio y activadas.** Mediante columnas se purificaron a las células T CD4 “naive” provenientes de ratones C57BL/6, MRL, MRL/lpr de 9 semanas de edad, las células fueron incubadas por dos días con: i) medio y ii) anti-CD3, TGF- $\beta$ , IL-6, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4 (células activadas). Al término de la incubación se determinó la expresión del receptor de PRL (\* $p < 0.05$ ).

Dentro de las células activas se determinó el porcentaje de las células que se diferenciaron a un fenotipo Th17 (CD4+ROR $\gamma$ t+), encontrando que las células T CD4 “naive” provenientes de la cepa MRL/lpr son las que tienen un mayor porcentaje de diferenciación a células Th17, ya sea incubadas sólo con citocinas o con citocinas y PRL (C57BL/6, 0.15  $\pm$  0.51% [medio], 18.08  $\pm$  0.53% [citocinas] y 19.18  $\pm$  0.60% [citocinas + PRL]; MRL, 0.28  $\pm$  0.46%, 17.63  $\pm$  2.25% y 17.77  $\pm$  0.90% y MRL/lpr, 1.17  $\pm$  0.14%, 34.62  $\pm$  1.44% y 34.80  $\pm$  1.51%), (figura 15).



**Figura 15. Porcentaje de células CD4+RORγt+.** Mediante columnas se purificaron a las células T CD4 “naive” provenientes de ratones C57BL/6, MRL, MRL/lpr de 9 semanas de edad, las células se incubaron por dos días con anti-CD3, TGF-β, IL-6, anti-IFN-γ, anti-IL-4. Al término de la incubación se tiñó el factor de transcripción RORγt y se calculó el porcentaje de células diferenciadas hacia un fenotipo Th17 (CD4+RORγt+), (\*p<0.05).

También se midió la expresión del receptor de PRL en las células CD4+RORγt+ (Th17), (C57BL/6 [3498.00±361.68], MRL [5941.00±128.56], MRL/lpr [6043.50±917.12]), y en las células CD4+RORγt-, (C57BL/6 [2700.00±213.57], MRL [4246.67±489.62], MRL/lpr [4570.00±568.51]), encontrando una mayor expresión del receptor en las células CD4+RORγt+ (Th17) que en las CD4+RORγt-. Comparando entre las cepas se observó que las cepas MRL y MRL/lpr expresaron mayor receptor de PRL que la cepa control C57BL/6 tanto en las células CD4+RORγt+ como en las CD4+RORγt- (figura 16).



**Figura 16. Expresión del receptor de prolactina en células CD4+ROR $\gamma$ t+ y CD4+ROR $\gamma$ t-.** Mediante columnas se purificaron a las células T CD4 “naive” provenientes de ratones C57BL/6, MRL, MRL/lpr de 9 semanas de edad, las células se incubaron por dos días con anti-CD3, TGF- $\beta$ , IL-6, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4. Al término de la incubación se tiñó el receptor de PRL y el factor de transcripción ROR $\gamma$ t (\* $p$ <0.05).

## DISCUSIÓN

El Lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune que presenta defectos en la tolerancia dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B. Existe una hiperreactividad de estos últimos que se identifica por la presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra diversas moléculas del núcleo (Grammer y Lipsky, 2003; Petri, 2008). En pacientes con LES se han descrito concentraciones séricas altas de PRL que correlacionan con la actividad de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Pacilio y col., 2001; Leañós y col., 2006). Mientras que en ratones que desarrollan lupus el estado de hiperprolactinemia exacerba la enfermedad y causa una mortalidad temprana al presentar un incremento de proteinuria y secreción de anticuerpos IgG principalmente dirigidos contra DNA (McMurray y col., 1991; McMurray, 2001).

Nuestros resultados mostraron que al inducir un estado de hiperprolactinemia con metoclopramida se exacerbó la enfermedad en las cepas MRL y MRL/lpr, corroborando lo publicado previamente en nuestro laboratorio (Ledesma y col., 2012). En estos ratones se decidió determinar las concentraciones séricas de IL-17, citocina producida por las células Th17 que aunque son importantes en la defensa del hospedero contra hongos y bacterias extracelulares, se ha demostrado que juegan un papel central en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como en el LES (Hirota y col., 2010; Nalbandian y col., 2009; Perry y col., 2011; Shin y col., 2011).

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la concentración sérica de IL-17 en las cepas que desarrollan lupus, MRL y MRL/lpr, comparados con la cepa control, C57BL/6, lo cual concuerda con una frecuencia incrementada de células T productoras de IL-17 en sangre periférica reportado en pacientes con LES (Alunno y col., 2012; Nalbandian y col., 2009; Pernis, 2009; Shah y col., 2010; Shin y col., 2011). Además los niveles séricos de IL-17 aumentaron con una diferencia estadísticamente significativa en aquellos ratones a los cuales se les indujo un estado de hiperprolactinemia en comparación con aquellos ratones tratados con PBS o no tratados (9 semanas), estos resultados nos sugieren que los niveles elevados de PRL podría favorecer el incremento de los niveles séricos de IL-17, actuando directamente sobre un tipo celular solamente en las cepas que desarrollan lupus. La IL-17 es producida por diferentes células del sistema inmune entre ellas las células Th17 (Shah K., 2010; Shin M., 2011) y

sabiendo que las células Th17 son importantes en la patogenia de lupus se decidió investigar si estas células expresan el receptor de PRL.

Nuestros resultados mostraron que las células T CD4 expresan el receptor de PRL igual que lo previamente reportado en humanos (Kelley K. y col., 2007; Legorreta y col., 2012). El grado de expresión del receptor depende del tipo de célula T CD4, los linfocitos CD4+CD62L+ “naive”, expresan menos receptor en comparación con las células T efectoras (CD4+CD62L-) activadas. Este comportamiento se observó en las 3 cepas estudiadas y concuerdan con lo reportado por Legorreta y col., quienes utilizando células T efectoras de personas sanas encontraron que la expresión del receptor de PRL incrementa al activar las células. Es posible que la baja expresión del receptor de PRL por las células T CD4 “naive” se deba a que son células que aún no han sido activadas por sus correspondientes antígenos llevados por las CPA, además de encontrarse en la etapa G<sub>0</sub> del ciclo celular (Kindt T. y col., 2007). También encontramos que las cepas que desarrollan lupus, MRL y MRL/lpr, expresan significativamente mayor receptor de PRL que la cepa control. Este comportamiento ya se había reportado pero en células B (Ledesma y col., 2012) donde las células B provenientes de ratones MRL y MRL/lpr expresan más receptor que las células B de los ratones control. Esto nos sugiere que tanto la PRL como su receptor pueden estar participando en la aparición de la enfermedad.

Sabiendo que las células T efectoras expresan el receptor de PRL, investigamos si las células Th17, dentro del conjunto de células T efectoras, son capaces de expresar el receptor de PRL. Al diferenciar las células T CD4 “naive” a un fenotipo Th17 (CD4+ROR $\gamma$ t+) encontramos que las células T CD4 “naive” provenientes de ratones MRL/lpr se diferencian más a Th17 que las del ratón control al ser incubadas ya sea con citocinas o con citocinas más PRL, esta susceptibilidad a diferenciarse a células Th17 podría ser apoyado por lo reportado en humanos donde los pacientes con LES presentan un incrementó en la frecuencia de células T productoras de IL-17 en sangre periférica (Alunno y col., 2012; Nalbandian y col., 2009; Pernis, 2009; Shah y col., 2010; Shin y col., 2011). Al no encontrar diferencia en el porcentaje de células T CD4 “naive” diferenciadas a un fenotipo Th17 ya sea incubadas con citocinas o con citocinas más PRL nos sugiere que la PRL bajo las condiciones en las que se utilizó (50ng/mL, incubada por 2 días a 37°C) y en las cepas utilizadas no tiene efecto alguno en favorecer la diferenciación *in vitro*.

En cuanto a la expresión del receptor de PRL nuestros resultados mostraron una mayor expresión del receptor de PRL en las células Th17 (CD4+ROR $\gamma$ t+) que en las células CD4+ROR $\gamma$ t-. Además las cepas MRL y MRL/lpr expresaron mayor receptor de PRL que la cepa control. Esto nos hace suponer un posible papel de la PRL sobre las células Th17 en la promoción y exacerbación de LES, ya que se sabe que la PRL está involucrada en la protección contra apoptosis y la supervivencia celular (Blanco y col., 2012).

## CONCLUSIONES

- ✓ El estado de hiperprolactinemia en ratones MRL y MRL/lpr incrementa los niveles séricos de IL-17.
- ✓ Las células T CD4 “naive” (CD4+CD62L+CD25-) expresan menor receptor de PRL que las células CD4+CD62L-CD25-.
- ✓ Las células T CD4 “naive” de la cepa MRL/lpr se diferencian en mayor proporción a un fenotipo Th17 que las cepas MRL y C57BL/6.
- ✓ Las células Th17 expresan el receptor de PRL en mayor proporción que las células T CD4+ROR $\gamma$ t-.
- ✓ La expresión del receptor de PRL es mayor en las células T CD4 “naive” y Th17 provenientes de ratones MRL y MRL/lpr que de ratones C57BL/6.

## **PERSPECTIVAS**

Con este trabajo se confirmó que el estado de hiperprolactinemia es capaz de exacerbar una enfermedad similar a LES en ratones MRL y MRL/lpr. Además se demostró que el estado de hiperprolactinemia incrementa los niveles séricos de IL-17 en ratones MRL y MRL/lpr y que el receptor de PRL se expresa en células Th17 (T CD4+ROR $\gamma$ t+). Por lo que resulta interesante investigar de qué manera la PRL podría favorecer la exacerbación de la enfermedad actuando sobre las células Th17.

## REFERENCIAS

- 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.
- Alunno A., Bartoloni E., Bistoni O., Nocentini G., Ronchetti S., Caterbi S., Valentini V., Riccardi C., Gerli R. 2012. Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus. The Old and the New. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2012:1-5.
- Andrews B., Eisenberg R., Theofilopoulos A., Izui S., Wilson C., McConahey P., Murphy E., Roths., Dixon F. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148:1198-1215.
- Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. 2009. Th17: Mice versus men. Human Th17 cells: Are they different from murine Th17 cells? *Eur. J. Immunol.* 39:634-675.
- Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. 2012. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in Immunology*. 33:505-512.
- Ben N., LaPensee C., LaPensee E. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endoc. Rev.* 29:1-41
- Bernichtein S., Touraine P., Goffin V. 2010. New concepts in prolactin biology. *J. Endocrinol.* 206:1-11.
- Bertsias G., Cervera R., Boumpas D. 2012. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. *Eular Fpp.* 476-505.
- Binart N., Bachelot A., Bouilly J. 2010. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21:362-368.
- Blanco F., Legorreta M., Huerta Y., Chávez K., Montoya E., Chávez L., Zenteno E. 2012. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Bol Med Hosp Infant Mex* 69(5):329-336.
- 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 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.
- 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.
- Brand J., Frohn C., Cziupka K., Brockmann C., Kirchner H., Luhm J. 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur Cytokine Netw* 15:99-104.
- Carreño P., Jimenez E., Sacodon R., Vicente A., Zapata A. 2004. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J. Neuroimmunol* 153:83-90.
- Carreño P., Sacodon R., Jimenez E., Vicente A., Zapata A. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol* 160:135-145.

Chavez K., Hernández J., Zenteno E., Leaños A., Legorreta M., Blanco F. 2005. Identification of prolactine as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clinical Immunology* 116:182-191.

Clevenger C., Freier D., Kline J. 1998. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *Journal of Endocrinology* 157:187-197.

De Laurentiis A., Pisera D., Caruso C., Candolfi M., Mohn C., Rettori V. and Seilicovich A. 2002. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic pituitary axis. *Neuroimmunomodulation*. 10:30-39.

Fainboim L., Geffner J. *Introducción a la Inmunología Humana*. Editorial Medica Panamericana, 6ª edición, Argentina, 2011.

Freeman M., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: structure function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80:1523-1631.

Furukawa F. and 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 in Murine Lymphoid Cells in Normal and Autoimmune Situations. *The Journal of Immunology* 150:5673-5681.

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

Grammer A. and Lipsky E. 2003. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rev. Ther Suppl* 4:S22-S27.

González C., Martín F., Ballester A., Ballester S. 2009. The Th17 lineage: Answers to some immunological questions. *Inmunología* 28:32-45.

Harrington L., Mangan P., Weaver T. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* Jun;18(3):349-56.

Hirota K., Martin B., Veldhoen M. 2010. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* 32:3-16.

Ignacak A., Kasztelnik M., Sliwa T., Korbut R., Rajda K. and Guzik T. 2012. Prolactin Not only lactotrophin. A "new view of the old" hormone. *J. of Physiology and Pharmacology*. 63:5:435-443.

Kelley K., Weigent D., Kooijman R. 2007. Proteins hormones and Immunity. *Brain Behav Immun.* 21 (4): 384-392.

Kindt T., Goldsby R., Osborne B. *Inmunología de Kuby*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 6ª edición, México, 2007.

Leaños A., Mondragón G. 2006. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 45:97-101.

Ledesma Y., Blanco F., Fuentes E., Tesoro E., Hernández R., Arriaga L., Legorreta M., Montoya E., Chávez L., Castro M., Chávez K. 2012. Higher levels of PRL receptor in Transitional 1 B

cells correlates with increased numbers of this population after PRL treatment and an early onset of lupus symptoms. *BMC Immunol.* 13:11.

Legorreta M., Chávez K., Montoya E., Arriaga L., Silva R., Chávez L., Moreno M., Zenteno E., Blanco F. 2012. Prolactin downregulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> regulatory T cell function in humans. *J Mol Endocrinol.* 48:77.

Lipsky E. 2001. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2:764-766.

Martínez G., Nurieva R., Yang X., Dong Ch. 2008. Regulation and Function of Proinflammatory Th17 Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173:188-211.

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.

McMurray R. 2001. Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus J. Immunol.* 10:742-747.

Mok C. y Lau C. 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481-490.

Molina J., Molina J., Espinoza L. 1995. Prolactina y lupus eritematoso sistémico. *Acta Médica Colombiana* 20(2):95-99.

Montes de Oca P., Macotela Y., Nava G., López-Barrera F., de la Escalera G., Clapp C. 2005. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Lab Invest* 85:633-642.

Nagy E., Berczi I., Wren G., Asa S. and Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacol.* 6:231-243.

Nalbandian A., Crispín J., Tsokos G. 2009. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clinical and Experimental Immunology* 157:209-215.

Orbach H. and Shoenfeld Y. 2006. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 6:537-542.

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.

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.

Pernis A. 2009. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Journal of Internal Medicine* 265:644-652.

Perry D., Peck A., Carcamo W., Morel L., Nguyen C. 2011. The current concept of Th17 Cells and Their Expanding Role in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis.* Volume 2011:1-10.

Perry D., Sang A., Yin Y., Zheng Y., Morel L. 2011. Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2011: 1-19.

Peters A., Lee Y., Kuchroo V. 2011. The many faces of Th17 cells. *Current Opinion in Immunology* 23:702-706.

Petri M. 2008. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:412-415.

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.

Schmidt C., Akdis M., Akdis C. 2007. Th17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin. Immunol.* 120:247-254.

Shah K., Lee W., Lee S., Kim S., Kang S., Craft J., Kang I. 2010. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 12:2-10.

Shin M., Lee N., Kang I. 2011. Effector T cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 23:444-448.

Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac. Rec.* 47:119-129.

Spangelo B., Farrimond D., Pompilius M. and Bowman K. 2000. Interleukin-1 beta and thymic peptide regulation of pituitary and glial cell cytokine expression and cellular proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:597-607.

Takizawa K., Kitani S., Takeuchi F., Yamamoto K. 2005. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr. J.* 52:635-641.

Waite J., Skokos D. 2012. Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Inflammation.* Volume 2012:1-10.

Watanabe R., Brannan C., Copeland N., Enkins N., Nagata S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nat.* 356:314-317.

## ANEXO

### Preparación de reactivos

#### PBS 10X pH 7.4

- NaCl 40.0g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.7g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8g
- Agua destilada 500mL

#### Regulador FACS

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

#### Regulador MACS

- PBS 1X 50mL
- BSA 0.5% 1.25mL
- EDTA 2mM o 0.5M 200μL

#### Medio RPMI suplementado

- Medio RPMI 50mL
- BSA 1% 2.5mL
- EDTA 0.5M 200μL

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

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

#### Solución de lavados

- PBS 1X
- Tween 20 al 2%

**Solución bloqueadora**

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

**Regulador de bicarbonatos pH 9.5**

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.795g
- $\text{NaHCO}_3$  1.465g
- Agua destilada 500mL

**Sustrato de la fosfatasa alcalina**

- Sustrato 2 tabletas de p-nitrofenil fosfato de 5mg
- Regulador de bicarbonatos 10mL
- $\text{MgCl}_2$  20 $\mu\text{L}$