



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DE LA PROLACTINA LINFOCITARIA Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN  
MUJERES DURANTE DIFERENTES FASES DEL CICLO MENSTRUAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GONZÁLEZ IBARRA LETICIA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FERNANDO LARREA GALLO**

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIA MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHAVEZ

**MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018**



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.



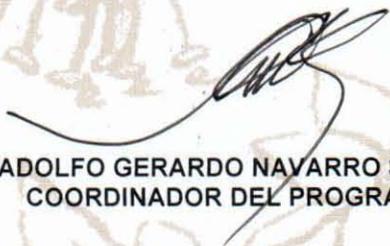
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 09 de octubre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GONZÁLEZ IBARRA LETICIA** con número de cuenta **95600608**, con la tesis titulada **"EXPRESIÓN DE LA PROLACTINA LINFOCITARIA Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN MUJERES DURANTE DIFERENTES FASES DEL CICLO MENSTRUAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO LARREA GALLO**:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
Vocal: DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ  
Secretario: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN  
Suplente: DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA  
Suplente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 04 de diciembre de 2017

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por la formación y el apoyo recibidos durante mi formación académica.

A CONACyT por la beca con número (CVU) 225967 que le fue otorgada en el periodo comprendido de agosto 09, 2010 a agosto 08, 2014.

A mi tutor el Dr. Fernando Larrea y a los miembros de mi Comité Tutor, al Dr. Ignacio Camacho Arroyo y al Dr. Gilberto Vargas Alarcón, por sus observaciones, consejos y orientación para la realización de esta tesis doctoral.

### Agradecimientos a título personal

A mi compañero y amigo Saúl Lira Albarrán por hacer más amena la estancia en el laboratorio y su gran apoyo en la realización de esta tesis.

A Verna Cásares por sus buenos consejos y su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio por todo su apoyo.

Al Departamento de Biología de la Reproducción por el apoyo recibido, tanto en espacio físico como en la compra de material de laboratorio.

## Dedicatorias

A mis padres, Juventino González Pimentel y Margarita Ibarra Sánchez por todo el cariño y apoyo incondicional que me han brindado. Gracias por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mi hermana Cecilia González Ibarra por escucharme y apoyarme en todo lo que hago. Gracias por estar conmigo.

## Índice

<b>Figuras y cuadros.....</b>	<b>I</b>
<b>Abreviaciones.....</b>	<b>II</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Generalidades.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Gen de la prolactina.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Regulación de la prolactina.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Las hormonas, el sistema inmunológico y el ciclo menstrual.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 La PRL y el sistema inmune.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Planteamiento del problema.....</b>	<b>11</b>
<b>3 Hipótesis.....</b>	<b>12</b>
<b>4 Objetivo general.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>5 Metodología.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1 Diseño del estudio y selección de la muestra.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1.1 Criterios de inclusión.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1.2 Criterios de exclusión.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1.3 Criterios de eliminación.....</b>	<b>15</b>
<b>5.2 Procedimientos.....</b>	<b>15</b>
<b>5.3 Cuantificaciones hormonales.....</b>	<b>15</b>
<b>5.4 Obtención y cultivo de la células mononucleares.....</b>	<b>16</b>
<b>5.5 Clasificación de los grupos.....</b>	<b>17</b>
<b>5.6 Extracción del RNA total.....</b>	<b>17</b>
<b>5.7 Regulación de la transcriptasa reversa (RT).....</b>	<b>18</b>
<b>5.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....</b>	<b>18</b>
<b>5.9 Cuantificación de IL-2 secretada al medio de cultivo por el análisis de ELISA.....</b>	<b>19</b>
<b>5.10 Análisis estadístico.....</b>	<b>20</b>
<b>6 Resultados.....</b>	<b>21</b>
<b>6.1 Características antropométricas y hormonales de las sujetos.....</b>	<b>21</b>

<b>6.2 Estandarización del RT-qPCR.....</b>	<b>22</b>
<b>6.2.1 Integridad del RNA.....</b>	<b>22</b>
<b>6.2.2 Selección del gen constitutivo.....</b>	<b>22</b>
<b>6.2.3 Variación Intra e Inter análisis.....</b>	<b>24</b>
<b>6.2.4 Sensibilidad y linealidad en la amplificación del qPCR.....</b>	<b>25</b>
<b>6.3 Expresión génica de la PRL y citocinas en PBMC sin activar y activadas con concanavalina A.....</b>	<b>26</b>
<b>6.4 Efecto del AMPc sobre la expresión génica de la PRL linfocitaria durante el ciclo menstrual.....</b>	<b>29</b>
<b>6.5 Regulación del gen de la PRL en PBMC activadas con concanavalina A.....</b>	<b>30</b>
<b>7 Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>8 Conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>9 Literatura citada.....</b>	<b>39</b>
<b>10 Anexos.....</b>	<b>43</b>
<b>10.1 Artículo requisito.....</b>	<b>43</b>
<b>10.2 Informe al paciente y carta de consentimiento informado.....</b>	<b>52</b>

## Figuras y cuadros

Figura 1. Estructura del gen de la PRL y sus regiones promotoras.....	5
Figura 2. Fases del ciclo menstrual.....	8
Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes analizados.....	19
Figura 3. Concentraciones circulantes de estradiol y progesterona en los tres grupos de estudio.....	21
Figura 4. Concentraciones circulantes de PRL en los tres grupos de estudio.....	22
Figura 5. Integridad del RNA.....	23
Tabla 2. Variabilidad de la expresión de los genes constitutivos entre los grupos de estudio.....	23
Tabla 3. Variabilidad de la expresión de los genes constitutivos por la activación de las PBMC.....	24
Figura 6. Curvas de amplificación del qPCR para el control de calidad.....	24
Tabla 4. Control de calidad del RT-qPCR.....	25
Figura 7. Curvas estándar y eficiencia del qPCR para los genes analizados.....	26
Tabla 5. Expresión génica de la PRL y citocinas en PBMC en condiciones basales y activadas con Con-A.....	27
Figura 8. Efectos del estradiol y progesterona sobre la expresión génica de la PRL.....	28
Figura 9. Efectos de la Con-A sobre la proliferación de las células PBMC.....	28
Figura 10. Efectos del 8Br-AMPC y PGE2 sobre la expresión del RNAm de la PRL.....	29
Tabla 6. Efectos de la PGE2 y del 8Br-AMPC sobre la expresión del gen de la PRL en PBMC no activadas.....	30
Figura 11. Correlación entre las concentraciones de IL-2 en medios de cultivo y la expresión génica de la PRL en PBMC activadas con Con-A.....	31
Figura 12. Efecto de la IL-2 sobre la expresión génica de la PRL y las concentraciones intracelulares de AMPC.....	31
Figura 13. Efecto de la Con-A sobre la expresión génica de la PRL, IL2 y AMPC intracelular.....	32

## Abreviaciones

PRL: prolactina	E2: estradiol
P4: progesterona	PRLR: receptor de la prolactina
ILs: interleucinas	IFNG: interferón gama
TNFa: factor de necrosis tumoral alfa	B2M: beta 2 microglobulina
ACTB: beta actina	RPL32: proteína ribosomal L32
PGE2: prostaglandina E2	Con A: concanavalina A
GCPR: receptores acoplados a proteínas G	AC: adenilato ciclase
JAK: janus cinasa	PI3K: fosfoinositol 3 cinasa
AMPc: Adenisin monofosfato cíclico	PKA: cinasa A de proteínas
PKC: cinasa C de proteínas	AP-1: proteína activadora 1
CRE: elementos de respuesta al AMPc	RNAm: ácido ribonucleico
DNAc: ácido desoxiribonucleico	RT: trasncriptasa reversa
Th: células T cooperadoras	LEG: lupus eritematoso generalizado
Kb: kilobases	KDa: kilodaltones
EEM: error estándar de la media	DE: desviación estándar
Ct: punto de cruce	IMC: índice de masa corporal
EIA: ensayo inmunoenzimático	RIA: radioinmunoanálisis
MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno	
GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	
ERK: cinasa regulada por señales extracelulares	
STAT: transductores de señal y activadores de la transcripción	
CREBP: proteínas de unión a los elementos de respuesta al AMPc	
PBMC: células mononucleares de sangre periférica	
ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo	

## Resumen

Son escasos los estudios sobre la regulación a nivel transcripcional del gen de la prolactina (PRL) en células del sistema inmunológico en condiciones fisiológicas como el ciclo menstrual. Las hormonas esteroides como son los estrógenos y la progesterona ( $P_4$ ) regulan diversas funciones en el sistema inmunológico, por lo que podrían participar en la regulación de la expresión de la *PRL* en estas células. Por esta razón, en este trabajo de tesis se evaluó la tasa de expresión génica de la *PRL* y su receptor a lo largo del ciclo menstrual en células mononucleares obtenidas de sangre periférica (PBMC) de mujeres sanas. Los resultados mostraron la ausencia de cambios en la expresión génica de la *PRL* y su receptor durante las fases del ciclo menstrual estudiadas. De manera similar, en las diferentes fases del ciclo menstrual no se modificó de manera significativa la expresión génica de las diferentes citocinas que fueron evaluadas. La activación de las PBMC por concanavalina A (Con A) se acompañó de la disminución de la expresión de la *PRL* y el aumento en la tasa de expresión génica de la *IL2*, independientemente de la fase del ciclo menstrual. Mientras activadores de la vía de AMPc (PGE2 y 8Br-AMPc) aumentaron su expresión, independientemente del ciclo menstrual. La presencia de anticuerpos específicos contra IL-2 inhibió de manera significativa los efectos de la Con A sobre la expresión génica de la *PRL*. Por otra parte, las concentraciones de IL-2 en medio de cultivo y la expresión génica de la *PRL* mostraron un patrón de correlación negativo. Estos resultados permitieron demostrar la ausencia de efectos del ciclo menstrual sobre la expresión génica de la prolactina linfocitaria y sugiere que cambios en la expresión diferencial de citocinas podrían contribuir a la regulación del promotor superdistal de esta hormona.

## Abstract

There are few studies on the regulation of prolactin gene expression in mononuclear cells under physiological conditions such as the menstrual cycle. Steroid hormones such as estrogen ( $E_2$ ) and progesterone ( $P_4$ ) regulate many functions in the immune system, so they could participate also in the regulation of *PRL* expression in this system. In this study, *PRL* gene expression and its receptor were evaluated during the menstrual cycle in PBMC. The results demonstrated no changes in *PRL* and *PRLR* gene expression during the different phases of the menstrual cycle studied. Similarly, gene expression of different cytokines was not significantly modified during the menstrual cycle. Concanavalina A decreased *PRL* expression and increased as well *IL2* expression in cultured PBMC, while PGE2 and 8Br-AMPC increased *PRL* expression, regardless of the menstrual cycle. Interleukin 2-specific antibodies significantly inhibited the effects of Con A on *PRL* gene expression. On the other hand, increasing IL-2 concentrations in culture medium correlate negatively with *PRL* expression. These results demonstrated the absence of changes in lymphocyte *PRL* expression during the menstrual cycle and suggest that differential gene expression of cytokines could contribute to the regulation of the superdistal promoter of this hormone.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Generalidades

La prolactina (PRL) es una hormona proteínica de 23 KDa de origen hipofisario y de otros sistemas como el inmunológico [1]. La PRL es probablemente la hormona con mayores propiedades y funciones biológicas descritas. Se le han descrito efectos a nivel reproductivo, sobre el crecimiento y desarrollo, en el balance hidroelectrolítico, metabólico, conductual e inmunoregulador, entre otros [1-3]. Esta diversidad de las acciones de la PRL es derivada de tres componentes: 1. Su polimorfismo estructural, 2. Su producción y procesamiento local en los diferentes órganos y tejidos en los que actúa, y 3. Las vías de señalización intracelulares divergentes y la regulación de sus genes blanco. La PRL de 23 KDa (o nativa) es la variante que es traducida a partir del RNAm, así como la que tiene la mayor actividad biológica con respecto a las otras variantes moleculares. El empalme alternativo del RNAm de PRL no es común y solo genera una variante de 137 aminoácidos, por lo que la mayoría de las variantes moleculares de la PRL son debidas a modificaciones postraduccionales como son la glicosilada, la fosforilada, la fosfatada, los productos de proteólisis (14 a 22 KDa) y las de mayor peso molecular (50 KDa a 150 KDa) [4]. De todas ellas, las variantes de mayor peso molecular son las que presentan menor actividad biológica, mientras que las de menor peso molecular (14 a 22 KDa) se les han reconocido propiedades antiangiogénicas [4, 5]. Se ha informado que las variantes de proteólisis, así como la PRL fosforilada son reguladas durante el ciclo menstrual [4]. Los efectos de la PRL los lleva a cabo a través de la unión a su receptor que pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas de clase I, y se caracteriza por tener tres dominios: uno transmembranal, uno extracelular y uno intracelular. La unión del ligando con su receptor activa diferentes vías de transducción de señales, entre las cuales destacan las vías janus cinasas/transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT) y cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK) [2], además de activar las vías de señalización c-src y Fyn [1]. En células del sistema inmunológico (como los linfocitos, monocitos y células mononucleares) la PRL es un factor de supervivencia y proliferación además de tener efectos anti-apoptóticos [6, 7]. Además, esta proteína actúa como una molécula adaptadora al estrés indispensable para limitar

los efectos indeseables de los glucocorticoides, participa en la biosíntesis y secreción de citocinas proinflamatorias, en la inducción de moléculas coestimuladoras de diversos subtipos celulares y en el aumento de la actividad presentadora de antígeno de estas células [8, 9]. Al mismo tiempo, el aumento en las concentraciones en suero de la PRL se han asociado con la patogénesis y progresión de enfermedades autoinmunes como es el caso del lupus eritematoso generalizado (LEG) [10, 11]. Incluso, se ha descrito la importancia de las distintas variantes moleculares de la PRL en la actividad de esta enfermedad [12]. Existen muchos estudios enfocados a los efectos de la PRL sobre el sistema inmunológico [6, 13-15], pero se conoce muy poco sobre los mecanismos y factores que pueden regular su expresión en células del sistema inmunológico. En este estudio decidimos investigar si existen cambios en la expresión de la PRL en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mujeres sanas durante las diferentes fases del ciclo menstrual.

## 1.2. Gen de la prolactina

El gen que codifica a la PRL humana se expande a lo largo de 15 Kb en el locus 6p22.2-p21.3, comprende cinco exones y cuatro intrones e incluye un exón adicional (exón 1a) que solo se transcribe en sitios extrahipofisarios como son los linfocitos y las PBMC. La transcripción del exón 1a, produce un transcrito con 150 nucleótidos adicionales al producto generado a nivel hipofisario [16, 17]. A pesar de esta diferencia, el producto de traducción es idéntico en ambos casos [16]. Es interesante señalar que la regulación del gen de la *PRL* se realiza a través de dos promotores independientes de manera tejido específica. En la hipófisis, el promotor proximal es el encargado de la regulación de este gen y es activado principalmente por elementos de respuesta para el factor de transcripción Pit-1. En contraste, en sitios extrahipofisarios como las PBMC, el gen de la *PRL* es regulado por el promotor superdistal que responde a factores como el AMPc, las proteínas STATs, el complejo AP-1, los estrógenos y la progesterona [16, 18-20] (Figura 1). Cabe destacar, que el gen de la *PRL* se encuentra evolutivamente conservado entre especies y gracias a ello, la evidencia sobre la regulación de ambos promotores proviene principalmente de modelos murinos. Sin embargo, en estos modelos murinos el promotor superdistal de la PRL no está presente a diferencia del

humano [20]. Por esta razón y a diferencia del conocimiento generado sobre el control de la actividad del promotor proximal del gen de la PRL [20], la regulación del promotor superdistal no es bien conocida, sobre todo la relacionada con situaciones fisiológicas como son el ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia.

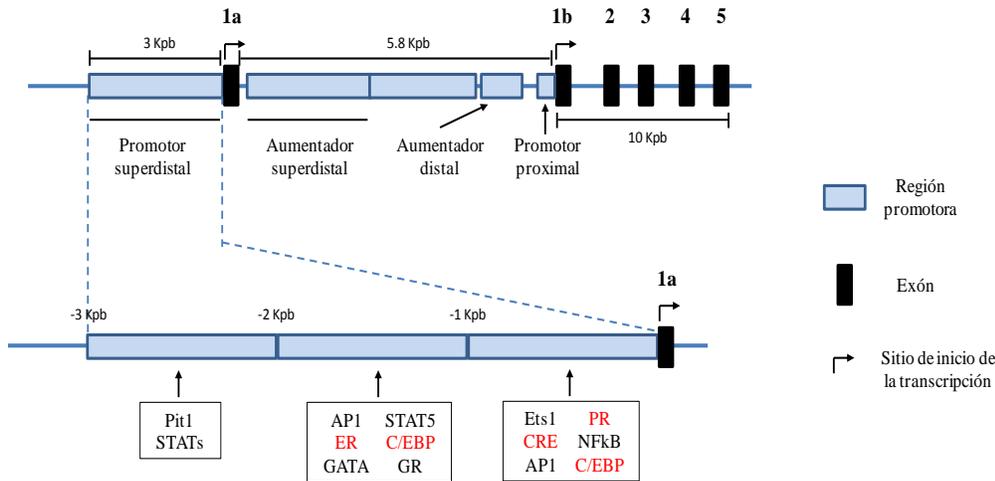


Figura 1. Estructura del gen de la PRL y sus regiones promotoras. Modificado de Refs. 17 y 20.

### 1.3. Regulación de la PRL

La PRL está ampliamente distribuida en todo el organismo incluyendo la glándula hipofisaria, los órganos reproductores como la decidua placentaria, la glándula mamaria, el ovario y el útero, el cerebro, el corazón, la piel, las células del sistema inmunológico, entre otros [2]. Como se mencionó en la sección anterior, la expresión de la PRL es regulada por dos promotores diferentes dependiendo del tejido, en parte por la presencia o ausencia de los diferentes factores de transcripción presentes en los diferentes sitios [20]. En la glándula hipofisaria, la dopamina es el principal factor regulador de la PRL [21] y su función es la inhibición de la síntesis y secreción de esta hormona por las células lactotróficas de la hipófisis anterior. La dopamina tiene dos tipos de receptores, los D1 y los D2 que pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GCPR). En los lactotrofos, las células especializadas en biosintetizar y secretar la PRL, sólo están presentes los receptores tipo D2 los que están acoplados a proteínas G inhibitorias (Gi). El

mecanismo de acción de la dopamina es la disminución de la producción intracelular del AMPc a través de la activación de las proteínas Gi, lo que conlleva a la supresión de la actividad de la vía dependiente de la PKA. A su vez, factores de transcripción dependientes de esta cinasa disminuyen la actividad transcripcional de la región promotora de Pit-1, principal factor de transcripción a nivel del promotor proximal del gen de la *PRL* [21]. Otros reguladores de la PRL hipofisaria como son las hormonas esteroides afectan la secreción de la PRL a través de modificar la actividad del sistema dopaminérgico [4]. A este respecto, el estradiol inhibe la biosíntesis de dopamina en las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares y regula tanto la amplitud de la secreción de prolactina como la actividad de la dopamina estriatal [22]. De manera adicional, el estradiol induce la expresión del gen que codifica a la prolactina mediante la activación de la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno/cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (MAPK/ERK1, 2) en líneas celulares derivadas de hipófisis anterior tales como las células GH3 y PR1 [23]. Durante el embarazo las elevadas concentraciones en suero del estradiol estimulan el crecimiento y proliferación de los lactotropos dando como resultado el aumento en la secreción de la PRL [3].

En contraste, existen pocos estudios sobre los factores que modifican la actividad transcripcional del promotor superdistal de la PRL en las células del sistema inmunológico. Sin embargo, se ha establecido que la regulación de este promotor es independiente de Pit-1, a pesar de la existencia de dos sitios consenso para este factor de transcripción [17, 19]. La actividad transcripcional del promotor superdistal del gen de la *PRL* es dependiente de la vía de señalización del AMPc en los linfocitos. Moduladores de esta vía como la prostaglandina E2 (PGE2) y los análogos del AMPc aumentan la actividad transcripcional del promotor superdistal a través de su interacción con elementos de respuesta a AMPc (CRE) presentes en el promotor [16, 24]. A este respecto, el AMPc aumenta la expresión génica de *PRL* por dos vías de señalización: una dependiente de la activación de PKA, a través de la fosforilación de proteínas de unión a los elementos de respuesta al AMPc (CREBP), y otra independiente de la activación de PKA, que permite la fosforilación de p38, un miembro de la familia de las MAPKs [25]. Por otra parte, estudios *in vitro* han informado que las hormonas esteroides (estradiol y progesterona) regulan la expresión de la *PRL*

extrahipofisaria a través de su unión con receptores nucleares [18, 26]. Se ha informado que citocinas como la IL-2, IL-4 e  $IFN\gamma$  inhiben la expresión de la *PRL* linfocitaria, a diferencia del  $TNF\alpha$  que la aumenta [27]; sin embargo, se desconocen las vías de señalización de estas citocinas sobre la expresión de la *PRL*.

#### 1.4. Las hormonas, el sistema inmunológico y el ciclo menstrual

La comunicación entre los sistemas neuroendócrino e inmunológico es bidireccional y necesaria para el correcto desarrollo del sistema inmune. La discontinuidad entre estas interacciones se asocia a enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares y psiquiátricas. La alta prevalencia de estas enfermedades en mujeres sugiere que factores de tipo hormonal podrían participar en la susceptibilidad y fisiopatología dependiente del género en estas enfermedades [28-30]. Existen diferentes condiciones fisiológicas en donde las concentraciones circulantes de las hormonas sexuales fluctúan de manera normal como son el ciclo circadiano, el ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia. El ciclo menstrual está caracterizado por un patrón cíclico de cambios hormonales que son regulados por mecanismos de retro-alimentación. El ciclo menstrual se divide en tres fases dependiendo de las fluctuaciones de las concentraciones de las hormonas esteroides ováricas. Las dos hormonas que son secretadas por los ovarios son el estradiol ( $E_2$ ) en la fase folicular y la progesterona en la fase lútea (Figura 2). Las concentraciones circulantes de  $E_2$  aumentan gradualmente durante la fase folicular del ciclo menstrual para inducir la liberación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH), así como la proliferación y diferenciación del endometrio. Mientras que en la fase lútea aumentan las concentraciones de  $P_4$  para estimular la maduración del endometrio preparándolo para la implantación [31]. Si la implantación no ocurre, las concentraciones de  $E_2$  y  $P_4$  disminuyen y la capa funcional del endometrio se desprende iniciando el sangrado menstrual. Por lo tanto, es apropiado considerar que el fin de un ciclo menstrual y el inicio del siguiente ambos ocurren en el primer día del sangrado [31]. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para la comunicación intracelular que regulan diversas funciones fisiológicas como la inflamación y la respuesta inmunológica local y sistémica. De manera funcional, las citocinas se dividen en dos subgrupos: las de tipo Th1 (IL-2,  $INF-\gamma$ , IL-12 y

TNF- $\alpha$ ,) también llamadas pro-inflamatorias, que principalmente activan la respuesta celular, y las de tipo Th2 o anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que activan la respuesta humoral. El sistema endócrino tiene un papel importante en el balance de las funciones pro y anti-inflamatorias del sistema inmunológico [32]. A este respecto, el balance entre la respuesta pro y anti-inflamatoria se modifica durante el ciclo menstrual [33].

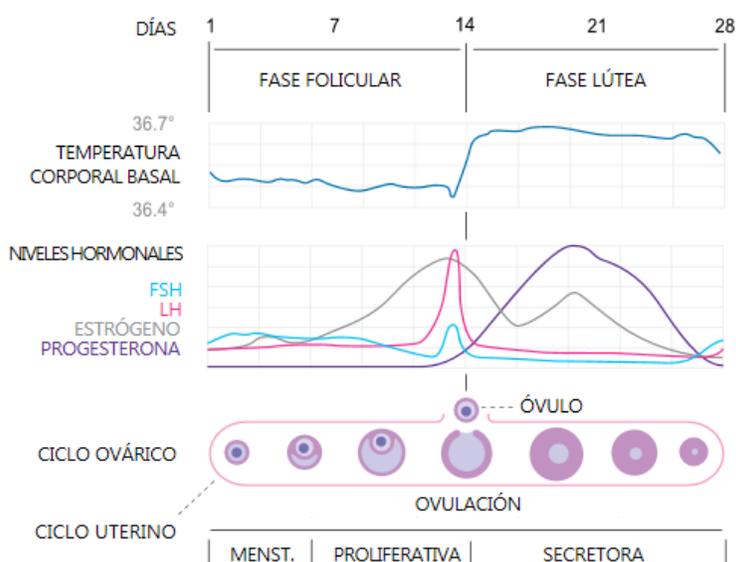


Figura 2. Fases del ciclo menstrual normal. Las fases del ciclo menstrual se pueden dividir dependiendo de las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>: la fase folicular dividida en temprana cuando hay bajas concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, y tardía cuando existen altas concentraciones solo de E<sub>2</sub>, la fase ovulatoria y la fase lútea cuando las concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> son altas. El ciclo menstrual también puede ser dividido de acuerdo al ciclo ovárico y uterino.

Ref. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/MenstrualCycle2\\_es.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/MenstrualCycle2_es.svg)

Es importante señalar que las hormonas esteroides (E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>) afectan diversas funciones del sistema inmunológico durante el ciclo menstrual, al regular los mecanismos de la implantación, y durante el embarazo para la tolerancia inmunológica de la madre [34]. Por ejemplo, en el endometrio la actividad de los linfocitos T citotóxicos está presente en la fase proliferativa del ciclo menstrual pero ausente en la fase secretora, lo que sugiere que altas concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> inhiben la actividad citotóxica de estas células durante la fase lútea del ciclo ovárico [35]. Los estrógenos son fuertes activadores de la respuesta inmunológica humoral y ésta depende de varios

factores. El primero y más importante es la presencia de sus receptores en las células blanco [32]. El segundo factor son las concentraciones circulantes de estas hormonas, por ejemplo,  $E_2$  induce la secreción de citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10) y disminuye la secreción de citocinas de tipo Th1 (IL-12,  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ ) a concentraciones altas, mientras que a concentraciones bajas puede inducir la secreción de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  [32]. Al mismo tiempo, esta hormona activa las vías de transducción de señal dependientes de AMPc y MAPK para la inducción de la expresión de sus genes blanco [36]. Por otra parte, la  $P_4$  es secretada durante la fase lútea del ciclo menstrual y tiene efectos directos sobre las células del sistema inmunológico. Esta hormona, inhibe la secreción de citocinas pro-inflamatorias, reduce moléculas presentadoras de antígenos en las células dendríticas, así como la capacidad proliferativa de las células T [30]. De manera adicional, la participación de la  $P_4$  sobre el sistema inmunológico se ha estudiado ampliamente durante el embarazo, donde tiene un efecto inhibitorio sobre ciertas citocinas pro-inflamatorias como el  $IFN\gamma$ , lo que se ha asociado a favor de la respuesta de tipo Th2 [37]. Este efecto es importante para la tolerancia del sistema inmunológico de la madre hacia el feto. La  $P_4$  al unirse a sus receptores estimula la diferenciación de las células T reguladoras, implicadas en la supresión de los procesos inflamatorios [32].

#### 1.5. La PRL y el sistema inmune

De la misma manera que las hormonas esteroides, la PRL también participa en la respuesta inmunológica. Los primeros estudios sobre la participación de esta hormona en el sistema inmunológico se realizaron en ratas hipofisectomizadas o tratadas con bromocriptina, un potente agonista dopaminérgico, y en estudios sobre la restauración de la respuesta inmunológica a través de la adición de la PRL [38][39][40]. Es relevante mencionar que la PRL se considera como una citocina debido a que comparte múltiples características que definen a este grupo de moléculas [15]. La PRL promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T al activar a la cinasa C de proteínas (PKC) [6]. Induce la respuesta de tipo Th1 al aumentar la secreción de citocinas tales como IL-12, IL-1, IL-6 e  $INF-\gamma$ , e incrementar el efecto de la IL-2 y la expresión de sus receptores en los linfocitos [41]. Asimismo, la PRL inhibe la apoptosis en los linfocitos inducida por los glucocorticoides a través de las vías de señalización

que incluyen la inducción de pim-1 y los miembros de la familia de la proteína antiapoptótica bcl-2 [42-44]. Todas estas funciones de la PRL sobre el sistema inmunológico son mediadas por un receptor específico expresado en las células mononucleares, los linfocitos T y B, los monocitos, las células dendríticas y las células asesinas naturales [45]. La unión del ligando a su receptor activa varias vías de señalización que incluyen a JAK/STAT, a MAPK y a la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) [4]. Todas estas vías son importantes para la proliferación y diferenciación de las células del sistema inmunológico. Al igual que las hormonas esteroides, la PRL se ha asociado con la actividad y progresión de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG). Esta condición se caracteriza por la pérdida de la tolerancia inmunológica y el aumento en la producción de autoanticuerpos [7, 14]. Esta relación con las hormonas esteroides es más evidente en modelos murinos de LEG [46, 47]. En estos modelos, particularmente en los ratones B/W y BALB/c el aumento en las concentraciones circulantes de la PRL o la administración exógena de la misma conduce a la progresión de la enfermedad y al desarrollo de las complicaciones de esta patología, sobre todo las que ocurren a nivel renal [46-48]. Todos estos cambios disminuyen de intensidad cuando las concentraciones circulantes de PRL son normalizadas o sus efectos son neutralizados con anticuerpos específicos [12, 49]. Sin embargo, no se conoce bien la participación de la PRL linfocitaria en estas patologías. A este respecto, nuestro grupo demostró que en PBMC de pacientes con LEG la expresión de la *PRL* se encuentra significativamente aumentada que en las células de sujetos control [50], lo que define a la PRL linfocitaria como un potencial biomarcador de la enfermedad. Con fundamento en estas observaciones además de la falta de información de los mecanismos hormonales que regulan la actividad del promotor superdistal de la PRL, en este estudio se decidió investigar los cambios en la expresión de la *PRL* y de otras citocinas en las PBMC obtenidas de mujeres voluntarias sanas durante diferentes fases del ciclo menstrual.

## 2. Planteamiento del problema

El ciclo menstrual de mujeres sanas se caracteriza por cambios en las concentraciones circulantes de varias hormonas tanto de origen ovárico como hipofisario. La regulación de estos cambios cíclicos es a través de mecanismos de retroalimentación que ejercen las hormonas esteroides sobre la liberación de las gonadotropinas a nivel hipofisario. Por otra parte, las hormonas esteroides influyen en otros sistemas a través de interactuar con receptores específicos localizados en el núcleo de las células blanco. Dentro de estos órganos blancos se encuentra el sistema inmunológico en donde las hormonas ováricas regulan la expresión de citocinas, particularmente en relación a sus efectos inhibitorios sobre la respuesta inmunológica proinflamatoria. La PRL, hormona de naturaleza proteínica es sintetizada, además de la glándula hipofisaria, por las células del sistema inmunológico cuya expresión génica se encuentra bajo la actividad de su promotor superdistal. En su estructura, este promotor presenta elementos de respuesta para receptores nucleares de hormonas esteroides. Dada la poca información que existe sobre los cambios a nivel de la expresión génica de la PRL de origen inmunológico durante la vida reproductiva de la mujer, el motivo de este estudio fue el análisis de la expresión de la PRL en PBMC obtenidas de mujeres sanas a lo largo del ciclo menstrual, caracterizado por cambios en las concentraciones circulantes de las hormonas ováricas e hipofisarias.

### 3. Hipótesis

$H_0$ : Los cambios hormonales que se presentan durante el ciclo menstrual no modifican la tasa de expresión basal de la prolactina en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de mujeres sanas.

$H_1$ : Los cambios hormonales que se presentan durante el ciclo menstrual modifican la tasa de expresión basal de la prolactina en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de mujeres sanas.

#### 4. Objetivo general

Establecer los cambios en la expresión génica de la prolactina durante el ciclo menstrual en células mononucleares obtenidas de mujeres sanas.

##### 4.1. Objetivos específicos

- i. Evaluar la expresión génica de la PRL y de su receptor en células mononucleares obtenidas de sangre periférica de mujeres sanas durante las diferentes fases del ciclo menstrual.
- ii. Determinar el perfil de citocinas Th1 (IL2, IFNG) y Th2 (IL10) en las PBMC obtenidas de sangre periférica de mujeres sanas durante el ciclo menstrual.
- iii. Identificar las asociaciones entre las concentraciones en suero de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, y la secreción de IL-2 en los medios de cultivo durante el ciclo menstrual con la expresión génica de la PRL linfocitaria y su receptor.

## 5. Metodología

### 5.1. Diseño del estudio y selección de la muestra

Se realizó un estudio de cohorte, longitudinal, prospectivo, observacional, descriptivo, prolectivo, con selección no aleatoria de los casos, y cegado para la cuantificación de las variables y el análisis estadístico de los datos. Se seleccionaron mujeres sanas estudiantes de distintos programas de residencia médicas en el Instituto Nacional de Perinatología y estudiantes del primero o segundo año de licenciatura de enfermería del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, que de manera voluntaria decidieron participar en el estudio.

#### 5.1.1. Criterios de inclusión:

- i. Mujeres sanas de 20 a 40 años de edad.
- ii. Ciclos menstruales regulares de 28 a 30 días de duración durante al menos los últimos 3 meses previos a la toma de la muestra de sangre.
- iii. Concentraciones circulantes de PRL de 2 a 20 ng/ml en fase folicular temprana, definida como el periodo comprendido en los días 3 a 5 del ciclo menstrual (tomando como día uno el primer día del sangrado menstrual).
- iv. Concentraciones circulantes de  $P_4$  postovulatoria  $\geq 3$  ng/ml (toma de muestra en el día 21 a 25 del ciclo menstrual regular).

#### 5.1.2. Criterios de exclusión:

- i. Diagnóstico de embarazo.
- ii. Si la paciente se encontraba en el periodo de puerperio o de lactancia.
- iii. Uso actual o tres meses previos de tratamiento hormonal anticonceptivo por cualquier vía de administración, así como el uso de anticoncepción hormonal de emergencia en el ciclo menstrual previo al día programado de la toma de muestra de sangre.
- iv. Antecedentes de alguna enfermedad endocrinológica como diabetes mellitus, distiroidismo, etc.
- v. Diagnóstico de enfermedades infecciosas al momento de la toma de muestra de sangre.

### 5.1.3 Criterios de eliminación:

- i. Diagnóstico de cuadros infecciosos durante las 24 h posteriores a la toma de muestra sanguínea.
- ii. Deseo de la paciente de abandonar el protocolo de estudio.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con número de registro BRE-309-11/13-1. La carta de consentimiento informado y la hoja de información al paciente se muestran en la sección de anexos.

### 5.2. Procedimientos

Con apego a la Declaración de Helsinki y tomando en cuenta lo dispuesto por la Ley General de Salud en su título quinto, el Reglamento General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en su capítulo III se solicitó consentimiento informado de cada una de las mujeres para realizar:

- i. Historia clínica completa (incluyendo el registro de sangrados menstruales del último año).
- ii. Mediciones antropométricas. El peso se determinó con el sujeto utilizando ropa ligera y sin zapatos en una báscula analítica (Tanita BC modelo 558). La talla se midió con un estadímetro portátil (Secca 214). El índice de masa corporal (IMC) se determinó al dividir el peso en kilogramos dividido entre la talla en metros al cuadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).
- iii. Toma de muestra de sangre periférica para obtención de células mononucleares y realizar cuantificaciones hormonales.

### 5.3. Cuantificaciones hormonales

Para la obtención de suero, se colectaron 7 ml de sangre periférica de cada una de las mujeres. Considerando un ciclo de 28 días, la toma de las muestras se realizó en los días 3, 12 y 21 del ciclo que corresponden a la fase folicular temprana, tardía y lútea, respectivamente. Se consideró como día 1 el primer día del sangrado menstrual. El suero se obtuvo por centrifugación a 3,000 rpm por 10 min (centrifuga Sorvall RT7) y se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en ultra congelación (REVCO) para su posterior procesamiento. Las concentraciones en suero de  $\text{P}_4$  y PRL se determinaron por análisis

inmunoenzimático (EIA) con estuches comerciales específicos (Immunometrics, Diagnostics Products Corporation, USA). Los coeficientes de variación intra e inter análisis, así como la sensibilidad de cada análisis fueron de 6.9%, 7.6% y 0.2 ng/ml para P<sub>4</sub>, 4.3%, 3.0% y 20 mUI/L para PRL. Las concentraciones en suero de E<sub>2</sub> se determinaron por radioinmunoanálisis (RIA) específico de acuerdo al protocolo del fabricante de los estuches comerciales (Count-a-count, SIEMENS). Los coeficientes de variación intra e inter análisis, así como la sensibilidad del análisis fueron de 7%, 8.1% y 8 pg/ml (29 pmol/L).

#### 5.4. Obtención y cultivo de las células mononucleares

Para la obtención de las PBMC, a cada mujer se le realizaron tres tomas de sangre durante un ciclo menstrual completo (toma I: días 1 a 5, toma II: días 10 a 12, y toma III: días 20 a 23, considerando el día 1 como el primer día del sangrado menstrual). Por cada toma, se colectaron 30 ml de sangre por punción de la vena antecubital entre 8:00 y 9:00 h previo ayuno de 8 h y se añadieron en un tubo con EDTA 0.5 M (1% del volumen de sangre) como anticoagulante. La sangre se diluyó en un volumen equivalente de solución salina al 0.9% y homogenizada por inversión suave. De la sangre diluida se añadieron lentamente en un volumen equivalente de Lymphoprep™ (Axis Shield, Oslo, Norway). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm (centrífuga Sorvall RT7) por 30 min a temperatura ambiente. Inmediatamente, las PBMC se recuperaron de la interface y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 pH 7.4 (GIBCO, Grand Island NY) centrifugando a 1,200 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El medio se decantó, las PBMC se resuspendieron en 20 ml de medio libre de suero AIM-V (GIBCO, Grand Island NY). Las células se contaron en una cámara de Neubauer por el método de tinción vital con azul tripán (0.4% peso/volumen) y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en el medio AIM-V (GIBCO, Grand Island NY) en presencia de los diferentes compuestos: 8Br-AMPc, PGE<sub>2</sub>, concanavalina A (Con-A) (Sigma-Aldrich) e IL-2 (Roche Diagnostics), por 24 h en presencia de una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, en ambiente húmedo a 37 °C. Al término de la incubación, las células se homogenizaron y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min (centrífuga Sorvall RT7). El medio se conservó en ultra congelación (REVCO) a -70 °C

hasta su procesamiento. Con el objetivo de evaluar la viabilidad y funcionalidad celular, se cultivaron  $1 \times 10^5$  células/ml en medio AIM-V (GIBCO, Grand Island NY) con o sin Con-A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) (Sigma-aldrich). Las PBMC se incubaron por 72 h en las mismas condiciones y se evaluó de manera indirecta su funcionalidad en términos de proliferación en respuesta a la Con-A utilizando el estuche comercial XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Brevemente, al término de la incubación, se agregó el reactivo colorimétrico XTT, que es metabolizado por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, dando un producto colorido que es directamente proporcional a la cantidad de células viables. A las 18 h posteriores se determinó la absorbancia a cada estímulo (por triplicado) a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Multiskan Labsystems).

#### 5.5. Clasificación de los grupos

Para el análisis de los datos, las muestras obtenidas de 26 mujeres se clasificaron en tres grupos de acuerdo a las concentraciones circulantes de  $E_2$  y  $P_4$ . Grupo I ( $n = 26$ ): concentraciones bajas de  $E_2$  y  $P_4$  ( $E_2 < 53.3 \text{ pg/ml}$  y  $P_4 < 2.5 \text{ ng/ml}$ ) que corresponden a la fase folicular temprana. Grupo II ( $n = 19$ ): concentraciones de  $E_2$  altas y de  $P_4$  bajas ( $E_2 > 53.3 \text{ pg/ml}$  y  $P_4 < 2.5 \text{ ng/ml}$ ) que corresponden a la fase folicular media y tardía. Grupo III ( $n = 20$ ): concentraciones de  $E_2$  y  $P_4$  altas ( $E_2 > 53.3 \text{ pg/ml}$  y  $P_4 > 3.7 \text{ ng/ml}$ ) que corresponden a la fase lútea. Se excluyeron aquellas mujeres que presentaron ciclos anovulatorios y concentraciones circulantes de PRL mayores a 20 ng/ml.

#### 5.6. Extracción de RNA total

El RNA total se obtuvo de las PBMC por el método de TRIzol [51] (Invitrogen, Carlsband CA). Al paquete celular se le adicionó 1 ml de TRIzol por cada  $3 \times 10^6$  células, se homogenizó y se separó en alícuotas de 1 ml. Posteriormente se adicionó cloroformo (0.2 ml por cada ml de TRIzol empleado) y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (ultra centrifuga Eppendorf 5417R). El RNA se recuperó de la fase acuosa y se precipitó con isopropanol (0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol empleado), se lavó con etanol al 80% (1 ml de etanol por cada ml de TRIzol empleado)

y se resuspendió en agua grado PCR (Roche Diagnostics). Finalmente, el RNA se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de  $\lambda = 260$  nm y se conservó en ultra congelación a  $-70$  °C para su posterior procesamiento mediante la reacción de la transcriptasa reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

#### 5.7. Reacción de la transcriptasa reversa (RT)

Debido a que la expresión del RNAm de los genes blanco fue muy baja en las PBMC, se sintetizó el DNA complementario (DNAc) a partir del RNA total. Para la síntesis de la primera cadena de DNAc se utilizó 1  $\mu$ g de RNA total como templado utilizando el estuche comercial Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un termociclador Perkin Elmer 9600 de la siguiente manera: un ciclo a 65 °C por 10 min, un ciclo a 55 °C de 30 min y un ciclo de 85 °C por 5 min. Posteriormente, el DNAc obtenido se amplificó utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

#### 5.8. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para la amplificación del DNAc de los genes de *PRL*, su receptor (*PRLR*), interleucina (*IL2*), interferón gama (*IFNG*) e IL10 por qPCR, se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados en la plataforma de acceso público de Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com), assay design center). La alineación con la secuencia de interés, se verificó en la página del BLAST (Basic Local Alignment Sequence) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para normalizar la expresión de los distintos genes blanco, se utilizaron oligonucleótidos para el gen constitutivo de la unidad ribosomal L-32 (*RPL32*). Las secuencias sentido y anti-sentido de cada uno de los genes analizados, así como del producto generado en las reacciones de amplificación, se muestran en la tabla 1. La reacción de qPCR se realizó en un termociclador LightCycler 2.0 de ROCHE (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) de acuerdo al siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa por desnaturalización a 95 °C por 10 min y después 45 ciclos de amplificación consistiendo

de 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 s a 72 °C. Para determinar las concentraciones de los genes analizados en cada muestra se utilizó la ecuación de la doble derivada  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes analizados.

Gen	Numero de acceso	Sentido	Antisentido	Producto
<i>PRL</i>	NM_000948.2	gcacaggagcaggtttgac	aaaggatcgccatggaaag	60 pb
<i>PRLR</i>	NM_000949.2	ggatgctttccacatgaacc	ggttgcagatgccacat	96 pb
<i>IL2</i>	S77834.1	aagttttacatgcccaagaagg	aagtgaaagttttgctttgagc	113 pb
<i>IFNG</i>	NM_000619.2	ggcattttgaagaattggaaa	ttggatgctctggtcatcttt	111 pb
<i>IL10</i>	NM_000572.2	tgggggagaacctgaagac	acaggaagaaatcgatgaca	62 pb
<i>RPL32</i>	NM_000994.3	tgttcaggatgtgtgatgaa	accgtcccttctctcttct	77 pb

PRL: prolactina, PRLR: receptor de prolactina, IL: interleucina, IFNG: interferón gama, RPL32: proteína ribosomal L32.

#### 5.9. Cuantificación de IL-2 secretada al medio de cultivo por el análisis de ELISA

Las concentraciones de IL-2 en medios de cultivo de PBMC se determinaron con estuches comerciales de ELISA (R&D Systems, Minneapolis MN, NY) en placas de 96 pozos con alta afinidad a proteínas (Costar, Corning incorporated NY) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las placas utilizadas fueron sensibilizadas con 100 µl de anticuerpo de captura, a la concentración recomendada en el protocolo comercial R&D, y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al término de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado (SL; PBS + 0.05% de Tween 20). Posteriormente, se adicionaron 300 µl de solución de bloqueo y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con SL. Se preparó una curva estándar de la citocina a determinar que incluyó 7 concentraciones por duplicado (15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 pg/ml). De cada muestra de suero o de medio de cultivo se adicionaron 100 µl por duplicado, y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con SL. Se adicionaron 100 µl anticuerpo de detección específico para la citocina y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se lavaron 3 veces con

SL. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante y se incubaron por 20 min en ausencia de la luz. Al finalizar la incubación, las placas se lavaron 3 veces con SL. A continuación, se adicionaron 100  $\mu$ l de solución sustrato R&D (1:1 peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina) y se incubaron por 20 min en ausencia de la luz. Inmediatamente después se detuvo la reacción con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 N. Finalmente, se cuantificó la absorbancia del producto colorido a una  $\lambda$  de 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Multiskan Labsystem). La cantidad del producto colorido formado fue directamente proporcional a la cantidad de citocina en la muestra.

#### 5.10. Análisis estadístico

Para cada variable cuantitativa se evaluaron los supuestos de sesgo, curtosis y ómnibus, para establecer las variables que presentan distribución normal. Para analizar diferencias entre variables cuantitativas con distribución normal y varianzas iguales, se utilizó prueba de ANOVA de medidas repetidas y para estudiar variables cuantitativas sin distribución normal se empleó la prueba U de Mann-Whitney (aproximación Z con corrección). Los resultados se presentaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM), independientemente del tipo de distribución, acompañado de la prueba t o U de Mann-Whitney (estadístico «t» o «Z», respectivamente) junto con el valor de «p». Las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete Number Cruncher Statistical System (NCSS) 2004; 329 North 1000 East, Kaysville, considerando como significativo un valor de «p» menor de 0.05.

## 6. Resultados

### 6.1. Características antropométricas y hormonales de las mujeres

La edad promedio de las sujetos fue de  $30 \pm 6$  años, peso de  $57.6 \pm 7.4$  Kg, talla de  $1.58 \pm 0.05$  m y un IMC de  $23.12 \pm 2.81$  kg/m<sup>2</sup>. El promedio de la duración de los ciclos menstruales, considerando como día uno el primer día del sangrado menstrual y el último como el primer día del siguiente sangrado, fue de  $28.16 \pm 0.68$  días. Después de la cuantificación de las concentraciones en suero del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub>, las muestras fueron colocadas dentro de los grupos descritos en la sección de Material y Métodos. Como se muestra en la figura 3, el grupo I consistió de 26 muestras caracterizadas por concentraciones promedio de E<sub>2</sub> de  $38.02 \pm 8.93$  pg/ml y P<sub>4</sub> de  $0.69 \pm 0.03$ , el grupo II por 19 muestras con valores promedio de E<sub>2</sub> de  $111.7 \pm 51.8$  pg/ml y P<sub>4</sub> de  $0.76 \pm 0.06$ , y el grupo III con 20 muestras con valores promedio de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> de  $169.2 \pm 86.8$  pg/ml y  $14.9 \pm 9.34$  ng/ml, respectivamente. Las concentraciones circulantes de PRL no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figura 4).

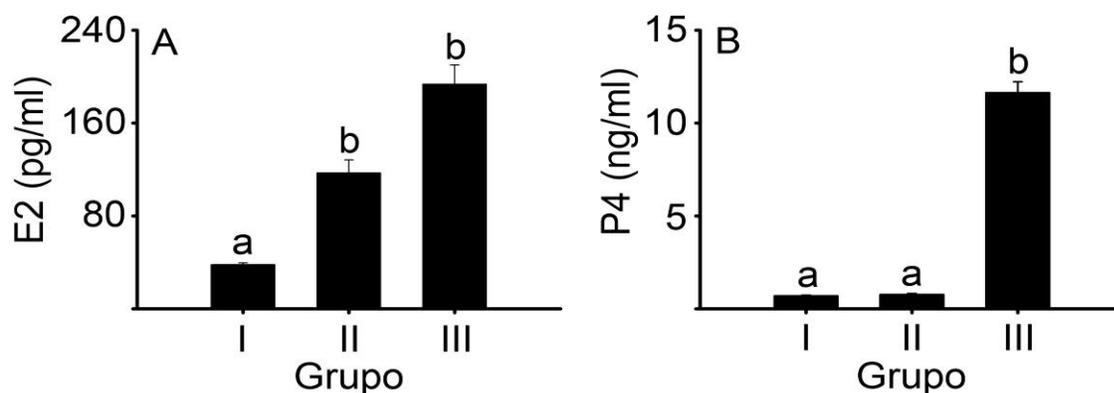


Figura 3. Concentraciones circulantes de A) estradiol: E<sub>2</sub> y B) progesterona: P<sub>4</sub> en los tres grupos de estudio. Los datos están representados por la media  $\pm$  EEM. Letras diferentes presentan diferencia estadística entre los grupos ( $a \neq b$ ),  $p < 0.05$  (prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis).

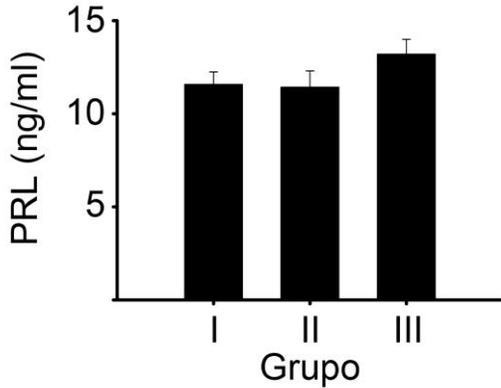


Figura 4. Concentraciones circulantes de PRL en los tres grupos de estudio. Los datos están representados por la media  $\pm$  EEM (prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis).

## 6.2. Estandarización del RT-qPCR

### 6.2.1. Integridad del RNA

Para evaluar la integridad del RNA total extraído de las PBMC de cada mujer, se cuantificaron las concentraciones de RNA total de cada muestra y se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Figura 5). La relación 260/280 de las muestras de RNA total fue de  $1.97 \pm 0.05$ , lo que indicó alto grado de pureza. Las muestras que no presentaron degradación del RNA total fueron procesadas por RT y qPCR, mientras que las que presentaron degradación del RNA fueron descartadas del estudio (Figura 5).

### 6.2.2. Selección del gen constitutivo

Para normalizar los datos de expresión de los genes blanco, se seleccionó un gen que no modificara su expresión a lo largo del ciclo menstrual. Para este fin, se evaluaron cuatro genes: *GAPDH*, *RPL32*, *B2M* y *ACTB*. Como se muestra en la tabla 2, la expresión génica de *RPL32* y *ACTB* no se modificó significativamente entre los grupos de estudio ( $p = 0.139$  y  $p = 0.064$ , respectivamente). Por el contrario, la expresión de los genes de *B2M* y *GAPDH* fue diferente entre los tres grupos estudiados ( $p = 0.049$  y  $p = 0.047$ , respectivamente).

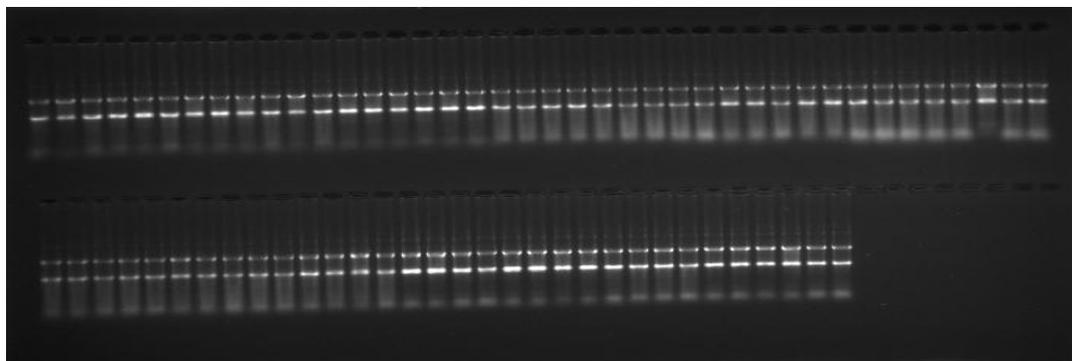


Figura 5. Integridad del RNA total. Muestras de RNA visualizadas en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 2. Variabilidad en la expresión de los genes constitutivos entre los grupos de estudio

Gen	Grupo I (Ct)	Grupo II (Ct)	Grupo III (Ct)	Valor p
<i>RPL32</i>	18.42 ± 0.426	18.69 ± 0.436	18.89 ± 0.379	0.139
<i>GAPDH</i>	17.29 ± 0.774	16.86 ± 0.432	16.44 ± 0.506	0.047
<i>B2M</i>	17.45 ± 0.651	18.12 ± 0.508	18.05 ± 0.306	0.049
<i>ACTB</i>	18.23 ± 0.847	18.78 ± 0.500	19.13 ± 0.604	0.064

Los resultados están representados como la media ± DE de los Ct, n = 7. Ct: ciclo umbral (cycle threshold) Valor de P (Prueba ANOVA, Kruskal-Wallis).

Por otra parte, se ha informado que la activación o diferenciación de las células modifica la expresión de ciertos genes que se han utilizado como constitutivos y esto puede dar como resultado datos inexactos. Por esta razón, se determinó la expresión de los cuatro genes constitutivos en PBMC estimuladas con Con-A u 8-Br-AMPc. Como se muestra en la tabla 3, la expresión de los cuatro genes se modificó al activar a las células con Con A. Sin embargo, el gen constitutivo *RPL32* fue el que presentó la menor variación entre ellos. Con base en estos resultados, se seleccionó al gen *RPL32* como gen constitutivo para normalizar los datos de expresión de los genes blanco.

Tabla 3. Variabilidad en la expresión de los genes constitutivos por la activación de las PBMC

Gen	Basal	8Br-AMPC	Con-A	Diferencia
<i>RPL32</i>	19.25 ± 0.04	18.54 ± 0.07	18.10 ± 0.12	1.15
<i>GAPDH</i>	21.22 ± 0.05	20.86 ± 0.06	19.23 ± 0.10	1.97
<i>B2M</i>	18.41 ± 0.27	18.30 ± 0.04	16.67 ± 0.02	1.74
<i>ACTB</i>	20.42 ± 0.03	20.73 ± 0.03	17.96 ± 0.03	2.46

Media ± DE de los valores de Ct, n = 3. Ct: ciclo umbral (cycle threshold).

### 6.2.3. Variación intra e inter análisis

Con el objetivo de determinar la variación intra análisis del qPCR, se calculó el coeficiente de variación con el valor del ciclo umbral (Ct) de cada gen analizado. Para esto se realizaron 10 réplicas de DNAC a partir de una muestra de RNA total procesada por la reacción de la transcriptasa reversa (RT) y, posteriormente, por la reacción de qPCR (Figura 6). Para cada gen analizado, se obtuvieron los Ct de cada muestra y se calculó el coeficiente de variación (CV) utilizando el promedio y la desviación estándar de cada muestra. El resultado mostró que el CV estuvo en un rango de 0.26 a 1.78 % (Tabla 4). De manera conjunta, se determinó la variación inter análisis del qPCR. Para tal motivo, se calculó el coeficiente de variación de los Ct obtenidos a partir de una muestra de RNA total procesada por RT y qPCR en tres días diferentes. El coeficiente de variación inter análisis no fue mayor de 1.5 %, con excepción del gen de *IL2* que fue de 2.82 % (Tabla 4).

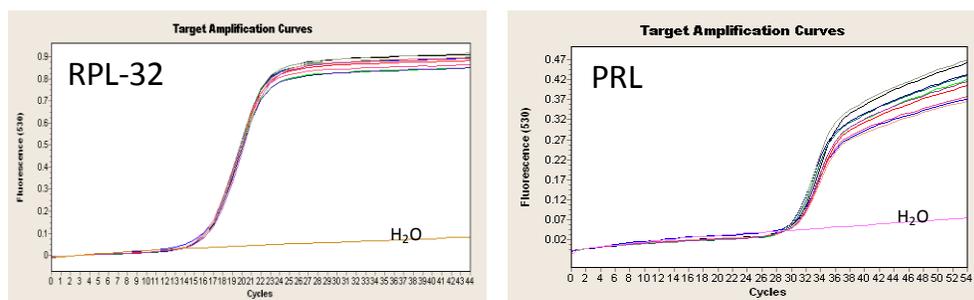


Figura 6. Curvas de amplificación del qPCR para el control de calidad. RPL32: proteína ribosomal L32, PRL: prolactina, H<sub>2</sub>O: control negativo del qPCR, n = 10.

Tabla 4. Control de calidad del RT-qPCR.

Gen	Variación intra análisis (n = 10)		Variación inter análisis (n = 3)	
	Media $\pm$ DE Ct	% CV	Media $\pm$ DE Ct	% CV
<i>RPL32</i>	16.28 $\pm$ 0.15	0.89	16.73 $\pm$ 0.22	1.33
<i>PRL</i>	30.31 $\pm$ 0.35	1.07	30.70 $\pm$ 0.33	1.08
<i>PRLR</i>	29.82 $\pm$ 0.15	0.49	29.64 $\pm$ 0.11	0.35
<i>IL2</i>	31.81 $\pm$ 0.12	0.37	31.31 $\pm$ 0.88	2.82
<i>IFNG</i>	27.58 $\pm$ 0.07	0.26	28.77 $\pm$ 0.37	1.28
<i>IL10</i>	33.50 $\pm$ 0.60	1.78	33.72 $\pm$ 0.38	1.13

*RPL32*: proteína ribosomal L32, *PRL*: prolactina, *PRLR*: receptor de prolactina, *IL*: interleucina, *IFNG*: interferón gama

#### 6.2.4. Sensibilidad y linealidad en la amplificación del qPCR

Para evaluar la sensibilidad y los límites de detección del método de qPCR se calculó la curva estándar y de eficiencia para cada gen. Para este propósito, se realizaron cuatro diluciones seriadas 1/10 de una muestra de RNA total (de 1000 a 1 ng) por triplicado y se procesaron por RT y qPCR. Los valores teóricos de la eficiencia y la pendiente de la curva en la qPCR son de 2 y 3.34, respectivamente. En nuestros resultados, la eficiencia de los genes estudiados varió de 1.9 a 1.66 (Figura 7). El límite de detección para el gen de *PRL* fue en el ciclo 36 que correspondió a la dilución de 1 ng de RNA total. Sin embargo, después del ciclo 35 los valores de expresión no son confiables debido a que se pierde la linealidad de la curva, es decir, la dispersión en las determinaciones y por lo tanto el margen de error, aumentan considerablemente. En el caso del *PRLR*, *IL2*, *IFNG* e *IL10* sus límites de detección fueron en los ciclos 32.1, 35.8, 33.9 y 38.4, respectivamente. De la misma manera que para el gen de la *PRL*, después de los ciclos 32 y 37.4 se pierde la linealidad de la curva de los valores de expresión de *IL2* e *IL10*, respectivamente. Con estos resultados de las curvas estándar y eficiencia, se utilizó 1  $\mu$ g de RNA total para procesar las muestras problema del estudio. De esta manera, se aseguró que los valores de expresión de los diferentes genes se encontrarán dentro de los límites de detección y por lo tanto fueran confiables (Figura 7).

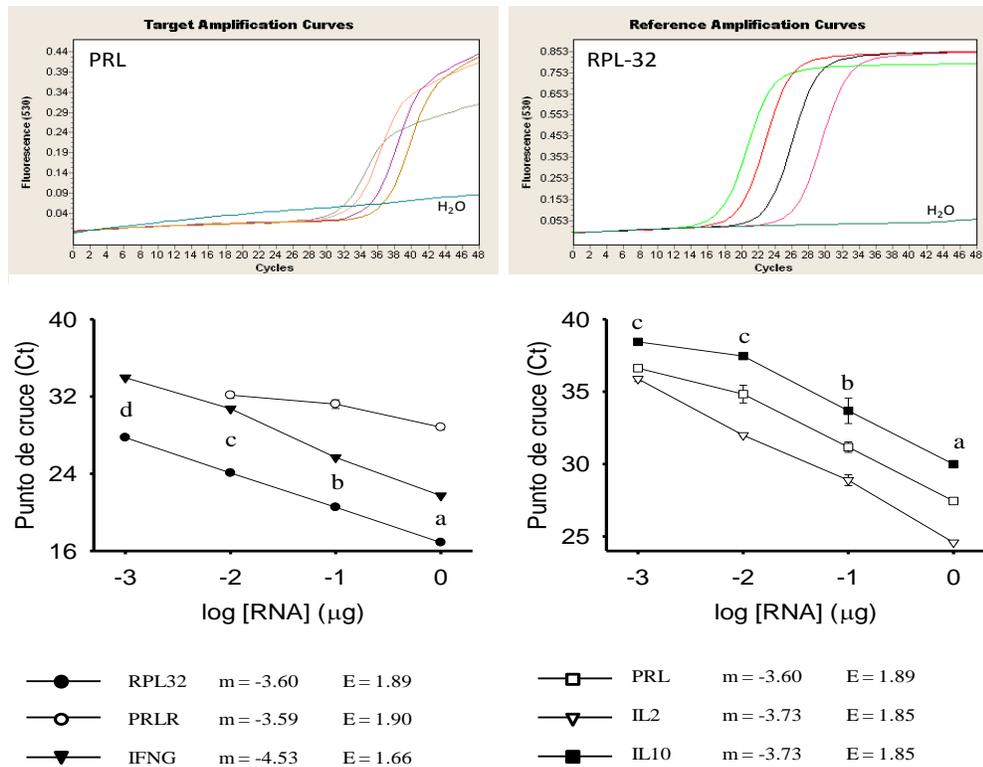


Figura 7. Curvas estándar y eficiencia del qPCR para los genes analizados. Los datos están representados por la media  $\pm$  DE,  $n = 3$ . Letras diferentes indican que existe diferencia estadística entre las concentraciones del RNA ( $a \neq b \neq c \neq d$ ) con una  $p < 0.05$  (ANOVA, Student-Newman-Keuls).

### 6.3. Expresión génica de la PRL y de citocinas en PBMC sin activar y activadas con Con-A

Para determinar la expresión del gen de la PRL linfocitaria durante el ciclo menstrual, las PBMC se obtuvieron en las tres fases del ciclo menstrual de acuerdo a los grupos previamente descritos. Los resultados mostraron que en condiciones basales la expresión génica de la PRL y la de su receptor no se modificaron durante el ciclo menstrual (Tabla 5). A pesar de no encontrar diferencias en la expresión de estos genes, se determinó la posible correlación con las hormonas esteroideas  $E_2$  y  $P_4$ . De igual manera, no se encontró correlación entre la expresión de la PRL y las concentraciones de  $E_2$  o  $P_4$  ( $r = 0.03$ ,  $p = 0.860$  y  $r = -0.008$ ,  $p = 0.962$ ,

respectivamente). Asimismo, no se observó correlación entre la expresión del *PRLR* y el  $E_2$  o  $P_4$  ( $r = 0.041$ ,  $p = 0.808$  y  $r = 0.231$ ,  $p = 0.174$ , respectivamente). De manera adicional, se realizaron cultivos celulares en presencia o ausencia de  $E_2$  y  $P_4$  en concentraciones similares a las prevalentes durante el ciclo menstrual. Los resultados mostraron que el  $E_2$  ( $1 \times 10^{-8}$  M) solo o en combinación con  $P_4$  ( $1 \times 10^{-8}$  M) no modificaron la expresión de la *PRL* en las PBMC (Figura 8).

Las hormonas esteroides  $E_2$  y  $P_4$  afectan diversas funciones del sistema inmunológico durante el ciclo menstrual como son la proliferación y la secreción de citocinas [52, 53]. Por este motivo, se evaluó el perfil de expresión de citocinas de tipo Th1 (*IL2* e *IFNG*) y Th2 (*IL10*) en células activadas y no activadas con Con-A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) en las diferentes fases del ciclo menstrual. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión génica de ninguna de las citocinas entre los grupos (Tabla 5). Por otra parte, la activación de las PBMC con Con-A aumentó la expresión génica de las citocinas independientemente de las fases del ciclo menstrual (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión génica de la *PRL* y citocinas en PBMC en condiciones basales y activadas con Con-A

Gen	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Basal	Con-A	Basal	Con-A	Basal	Con-A
<i>PRL</i>	$3.88 \pm 0.66$	$1.02^* \pm 0.27$	$5.44 \pm 1.04$	$1.28^* \pm 0.26$	$4.09 \pm 1.11$	$1.26^* \pm 0.38$
<i>PRLR</i>	$0.76 \pm 0.29$	$0.36 \pm 0.05$	$0.71 \pm 0.16$	$0.42 \pm 0.15$	$1.04 \pm 0.44$	$0.59 \pm 0.19$
<i>IL2</i>	$1.12 \pm 0.20$	$122^* \pm 35.7$	$1.12 \pm 0.24$	$114^* \pm 25.7$	$1.34 \pm 0.43$	$119^* \pm 31.5$
<i>IFNG</i>	$13.3 \pm 2.46$	$510^* \pm 151$	$16.2 \pm 3.18$	$487^* \pm 85.1$	$17.1 \pm 3.40$	$607^* \pm 219$
<i>IL10</i>	$6.06 \pm 1.97$	$18.5^* \pm 4.78$	$5.29 \pm 1.65$	$17.3^* \pm 5.11$	$11.3 \pm 3.67$	$21.6^* \pm 5.02$

Basal: células en medio de cultivo, Con-A: concanavalina A. Los datos de expresión fueron normalizados contra el gen constitutivo *RPL32* y representados como la media  $\pm$  EEM ( $1 \times 10^{-4}$ ), \* $p < 0.05$  vs basal

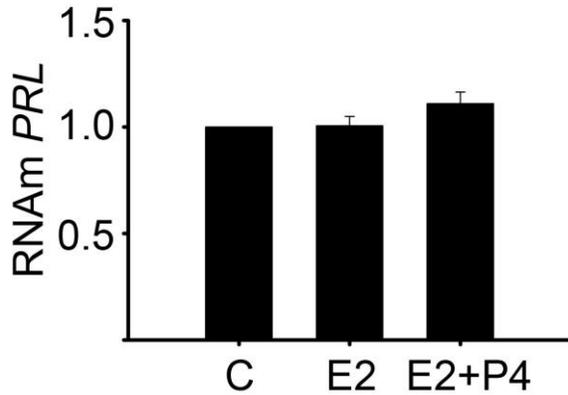


Figura 8. Efecto del estradiol (E2) y la progesterona (P4) sobre la expresión génica de la PRL. Los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo *RPL32*. Al control (PBMC no estimuladas, C) se le asignó el valor arbitrario de 1. Los datos están representados como la media  $\pm$  EEM de 6 experimentos independientes a las 24 h de tratamiento (prueba t de Student).

La *IL2* fue la citocina que presentó el mayor aumento en su expresión en presencia de Con-A (108 veces vs basal), mientras que la expresión del *IFNG* y la *IL10* aumentó 38 y 3 veces, respectivamente (Tabla 5). Por el contrario, la expresión génica de la *PRL* disminuyó en presencia de Con-A hasta en un 85%. Los cambios de expresión de la *PRL* en presencia de Con-A, no fueron secundarios a los efectos de Con-A sobre la viabilidad celular (Figura 9).

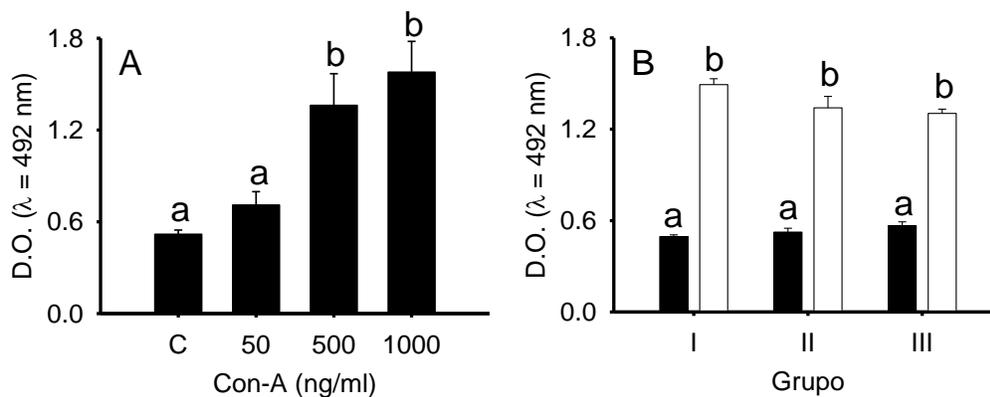


Figura 9. Efecto de la concanavalina A (Con-A) sobre la proliferación de las PBMC. Panel A: Proliferación de las PBMC en presencia de concentraciones crecientes de Con-A, C: condiciones

basales. Panel B: proliferación de las PBMC durante las fases del ciclo menstrual (Grupo I, II y III), las barras negras representan las condiciones basales y las blancas el estímulo con Con-A (1  $\mu\text{g/ml}$ ). La proliferación celular se determinó de manera indirecta utilizando el reactivo colorimétrico XTT, donde la absorbancia (D.O.) es directamente proporcional al número de células. Los datos están representados como la media  $\pm$  EEM,  $n = 3$ . Letras diferentes indican que existe diferencia estadística entre los estímulos ( $a \neq b$ ),  $p < 0.05$  (prueba de ANOVA, Student-Newman-Keuls) y prueba t de Student en el caso de basales vs Con-A).

#### 6.4. Efecto del AMPc sobre la expresión del gen de la PRL linfocitaria durante el ciclo menstrual

El AMPc es el principal regulador de la expresión de la PRL linfocitaria (Figura 10), por lo que se evaluaron los efectos de PGE2 y 8Br-AMPc sobre la expresión de la PRL a diferentes estadios del ciclo menstrual. Para este propósito, las PBMC se cultivaron en presencia y ausencia de estos compuestos en los diferentes grupos y se determinó la expresión de la PRL. De acuerdo a lo esperado, la PGE2 ( $1 \times 10^{-6}$  M) y el 8Br-AMPc ( $1 \times 10^{-3}$  M) aumentaron de manera significativa la expresión de la PRL linfocitaria, sin embargo, su efecto fue independiente de las fases del ciclo menstrual en las que fueron obtenidas las muestras de sangre (Tabla 6).

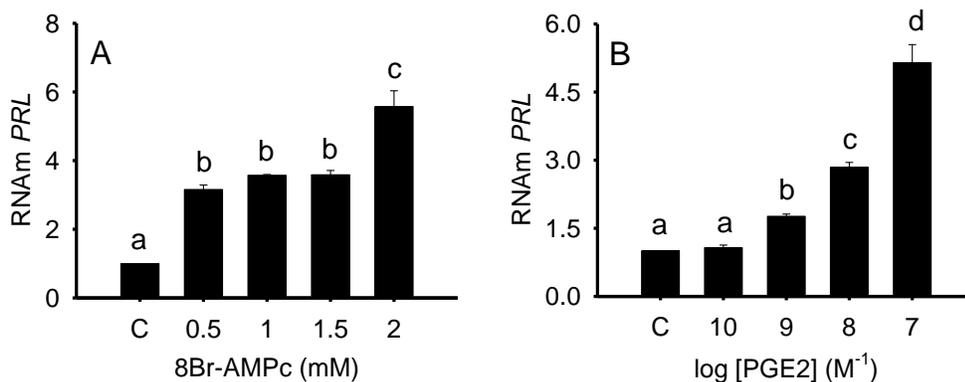


Figura 10. Efecto del 8Br-AMPc (A) y la prostaglandina E2 (B) sobre la expresión del RNAm de la PRL. Los datos de expresión están normalizados contra el gen constitutivo *RPL32* y al control (C) se le asignó el valor arbitrario de 1. Los resultados están representados como la media  $\pm$

EEM de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican que existe diferencia estadística entre los estímulos ( $a \neq b \neq c \neq d$ ),  $p < 0.05$  (prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis).

Tabla 6. Efecto de la PGE2 y el 8Br-AMPC sobre la expresión del gen de la PRL en PBMC no activadas

Estímulo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Valor p
Basal	$3.88 \pm 0.66$	$5.44 \pm 1.04$	$4.09 \pm 1.11$	0.536
PGE2	$6.05^* \pm 1.16$	$8.85^* \pm 1.93$	$6.19 \pm 1.71$	0.391
8Br-cAMP	$8.30^* \pm 1.53$	$10.5^* \pm 2.44$	$8.24^* \pm 2.02$	0.681

PGE2: prostaglandina E2. Los datos de expresión fueron normalizados contra el gen constitutivo *RPL32* y representados como la media  $\pm$  EEM ( $1 \times 10^{-4}$ ), \* $p < 0.05$  vs basal (Prueba U de Mann-Whitney).

#### 6.5. Regulación del gen de la PRL en PBMC activadas con concanavalina-A

Como se muestra en la tabla 5, la Con-A inhibió la expresión del gen de la *PRL* con respecto a las condiciones basales. Estos resultados sugieren que la Con-A podría regular la expresión de la *PRL* en los linfocitos de manera directa o por activación de factores que son regulados por este activador.

Se seleccionó a la IL-2 como posible factor regulador debido a que fue la citocina estudiada que presentó la mayor inducción en su expresión por acción de la Con-A. De esta manera, se evaluó la secreción de la IL-2 en los medios de cultivo de las PBMC activadas con Con-A y se determinó su correlación con la expresión de la *PRL*. Los resultados mostraron una correlación negativa y estadísticamente significativa ( $r = -0.641$ ,  $p = 0.004$ ) entre la secreción de IL-2 y la expresión de la *PRL* (Figura 11). Además, la presencia de concentraciones crecientes de IL-2 inhibieron la expresión génica de la *PRL* en estas células (Figura 12, panel A), y este efecto fue independiente de las concentraciones intracelulares de AMPc (Figura 12, panel B).

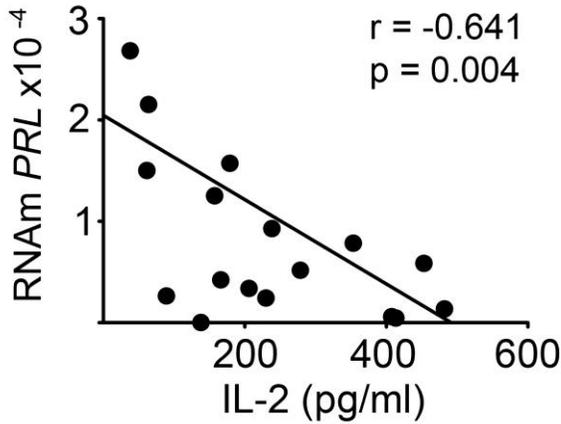


Figura 11. Correlación entre las concentraciones de IL-2 en medios de cultivo y la expresión génica de la *PRL* en PBMC activadas con Con-A. Los datos de expresión de la *PRL* están normalizados contra el gen constitutivo de *RPL32*.  $r = -0.641$ ,  $p = 0.004$ ,  $n = 17$  (correlación de Spearman).

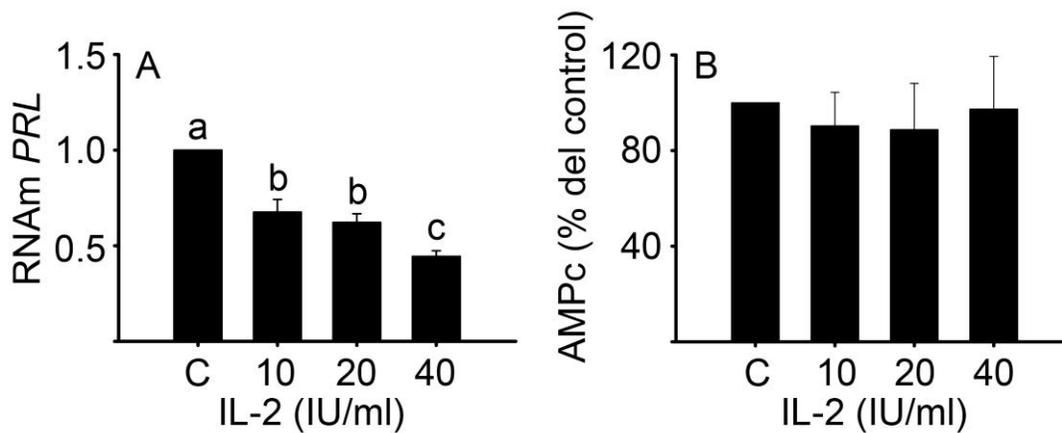


Figura 12. Efecto de la IL-2 sobre la expresión génica de la *PRL* (A) y las concentraciones intracelulares de AMPc. Los datos de expresión están normalizados contra el gen constitutivo *RPL32* y al control (C) se le asignó el valor arbitrario de 1. Los datos de AMPc están representados como porcentaje con respecto al control (C). Los resultados están representados como la media  $\pm$  EEM,  $n = 4$ . Letras diferentes indican que existe diferencia estadística entre los estímulos ( $a \neq b \neq c$ ),  $p < 0.05$  (prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis).

De manera adicional, se realizaron cultivos en presencia de concentraciones crecientes de Con-A (50 a 1000 ng/ml) y se evaluó la expresión de *PRL* e *IL2* en las PBMC. De manera similar a los resultados previos, la presencia de Con-A inhibió la expresión génica de la *PRL* (Figura 13, panel A), mientras que indujo la expresión de *IL2* (Figura 13, panel B), sin cambios en las concentraciones intracelulares de AMPc (Figura 13, panel C). Cuando las PBMC fueron cultivadas en presencia de un anticuerpo específico contra la IL-2, el efecto inhibitorio de la Con-A sobre la expresión de la *PRL* se revirtió parcialmente pero de manera significativa (Figura 13, panel D). El efecto del anticuerpo anti-IL-2 fue específico debido a que la adición de una inmunoglobulina no relacionada no modificó el efecto de la Con-A sobre la expresión de la *PRL* (Figura 13, panel D).

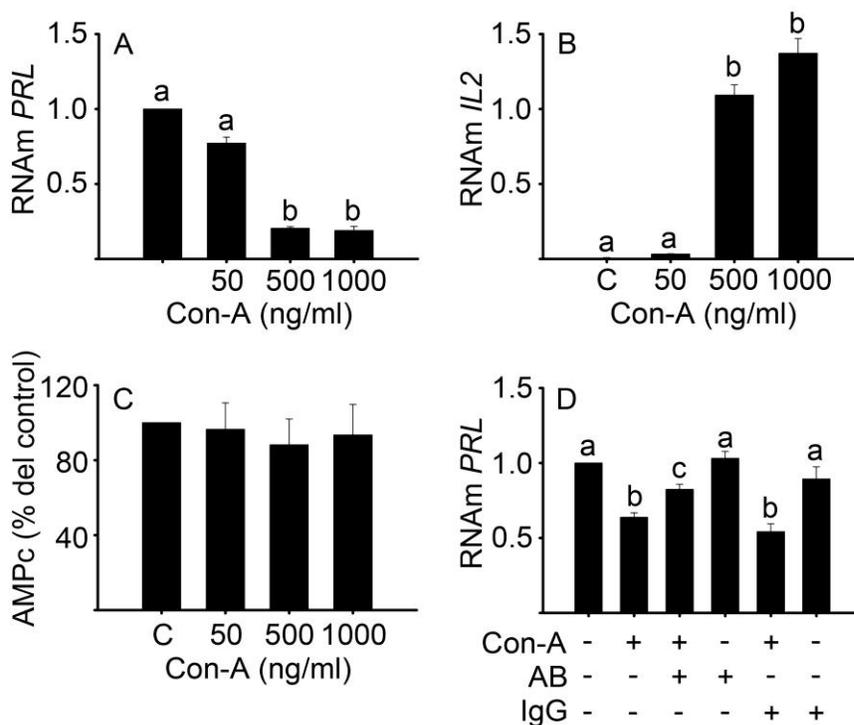


Figura 13. Efecto de la Con-A sobre la expresión génica de *PRL* (A), *IL2* (B) y AMPc intracelular (C). Adicionalmente, la expresión de la *PRL* se evaluó en presencia o ausencia de un anticuerpo específico para IL-2 (AB) o suero pre-inmune (IgG) en PBMC activadas con Con-A (1µg/ml). La expresión de la *PRL* e *IL2* fue normalizada contra el gen constitutivo *RPL32*. Al control (C) se le asignó el valor arbitrario de 1. Las concentraciones de AMPc intracelular están expresadas como en porcentaje con respecto al control. Los resultados están representados como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $a \neq b \neq c$ ),  $p \leq 0.05$  (prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis).

## 7. Discusión

La PRL es una hormona muy versátil con múltiples funciones y sintetizada en diferentes órganos y tejidos, entre ellos las células del sistema inmunológico. Su regulación en estas células ha sido poco estudiada, incluso en condiciones fisiológicas como el ciclo menstrual. Por tal motivo en el presente trabajo de tesis, se investigó la expresión de la *PRL* linfocitaria en diferentes fases del ciclo menstrual en mujeres sanas. Los resultados indicaron que la expresión génica de la *PRL* no se modificó durante el ciclo menstrual en las PBMC. Los mecanismos que regulan la expresión de la *PRL* en las células del sistema inmunológico son escasos a diferencia de su regulación en la hipófisis donde es ampliamente conocida [20]. Por ejemplo, se ha informado que en sujetos sanos las concentraciones circulantes de PRL, que son principalmente de origen hipofisario, no varían durante el ciclo menstrual pero tienden a ser mayores en la fase lútea [54]. En nuestros resultados se observó un comportamiento similar, donde las concentraciones de PRL en suero aumentaron durante la fase lútea comparadas con la fase folicular (de 13.19 ng/ml a 11.57 ng/ml, respectivamente), aunque no mostró diferencias estadísticamente significativas. En modelos *in vitro* y en diferentes tipos celulares, se demostró que el  $E_2$  y la  $P_4$  regularon al promotor superdistal de la *PRL* por interacciones directas de sus receptores nucleares con los elementos de respuesta presentes en este promotor [18, 26, 55]. Por ejemplo, en células T47D transfectadas con el promotor superdistal, la actividad transcripcional de este promotor aumentó en presencia de  $E_2$  [18]. En el caso de la  $P_4$ , esta hormona puede inhibir o aumentar la expresión o la secreción de la PRL dependiendo del tipo de tejido en estudio [26, 55]. En contraste con estos hallazgos nuestros resultados sugieren que las concentraciones fisiológicas de  $E_2$  y  $P_4$  presentes en sangre durante el ciclo menstrual no modifican la tasa de expresión génica de la *PRL* en las PBMC tanto en condiciones basales como estimuladas. De igual manera, los cultivos de PBMC incubadas en presencia de  $E_2$  y  $P_4$  no mostraron cambios en la expresión de la *PRL*, lo que apoya nuestras observaciones *in vivo*.

La regulación de la síntesis y secreción de la PRL en la glándula hipofisaria, así como en la decidua placentaria y en el endometrio, se encuentra influenciada por las

hormonas esteroides [20]. Sin embargo, la falta de significancia estadística en la expresión génica de la *PRL* en las PBMC tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiere que las hormonas esteroides  $E_2$  y  $P_4$  no participan de manera directa en la regulación de la expresión de la *PRL* linfocitaria. En el modelo murino, los efectos de los estrógenos sobre el gen de la *PRL* son más evidentes debido a que el promotor de este gen tiene un elemento de respuesta funcional para el receptor de estrógenos. Mientras que en el humano, la regulación del gen de la *PRL* es más compleja por el uso de dos promotores que lo modulan de manera específica del tejido [17, 20]. Asimismo, las condiciones de cultivo *in vivo*, *in vitro* y el tipo celular influyen sobre la actividad transcripcional de ambos promotores. Un ejemplo de esto es en el endometrio donde la  $P_4$  modifica la expresión génica de la *PRL* a través de la unión a sus receptores clásicos, que pertenecen a la súper familia de receptores nucleares [26]. Sin embargo, la  $P_4$  *per se* no modifica la expresión de la *PRL* decidual sino que requiere la presencia de AMPc para aumentar de manera sinérgica a esta hormona [26]. A diferencia del endometrio, los linfocitos presentan receptores de la  $P_4$  no clásicos que se encuentran en la membrana. Estos receptores están acoplados a proteínas G inhibitorias [56], lo que sugiere que la vía del AMPc podría estar involucrada en los efectos de la  $P_4$  en estas células. De la misma manera, el  $E_2$  puede activar esta vía de señalización en las células del sistema inmunológico para regular la expresión de sus genes blanco [36]. Debido a que el AMPc es el principal regulador de la expresión génica de la prolactina linfocitaria [16, 19, 25], se estudió la posible participación del  $E_2$  y la  $P_4$  sobre esta vía de señalización en términos de expresión génica de la *PRL*. Como era de esperarse, el 8Br-AMPc y la PGE2 aumentaron la expresión del gen de la *PRL* linfocitaria en los cultivos de PBMC, pero sus efectos no fueron diferentes durante las distintas fases del ciclo menstrual. Estos resultados sugieren que los cambios hormonales que suceden durante el ciclo menstrual no modifican o condicionan la respuesta al 8Br-AMPc y la PGE2 en términos de la tasa de expresión de la *PRL*.

Las mujeres son más susceptibles a desarrollar enfermedades autoinmunes comparadas con los hombres [57], aunque las razones para esta susceptibilidad son poco estudiadas. En este sentido, las hormonas sexuales podrían tener una participación importante en las diferencias observadas entre los géneros, con los

estrógenos participando en la inmunidad humoral y los andrógenos y progesterona como inmunosupresores naturales. Las hormonas sexuales son reguladas durante el ciclo menstrual y la PRL presenta cambios circadianos. Estos cambios cíclicos también se han presentado en el sistema inmunológico. Sin embargo, los resultados no son consistentes en términos de concentraciones y actividad funcional de los linfocitos [58]. Un ejemplo es el perfil de expresión y secreción de citocinas que cambia a lo largo del ciclo menstrual donde se favorece la respuesta antiinflamatoria en la fase lútea del ciclo [59]. Asimismo, las hormonas esteroides inhiben los procesos inflamatorios, en particular la actividad proinflamatoria de los monocitos [52]. En nuestros resultados no encontramos diferencias significativas sobre la expresión génica de algunas citocinas de tipo Th1 o Th2 en las PBMC durante el ciclo menstrual, tanto en condiciones basales como estimuladas. Al mismo tiempo, tampoco se encontró correlación entre las concentraciones circulantes de  $E_2$  y  $P_4$  sobre la expresión de estas citocinas. Esta falta de correlación entre las hormonas esteroides y las citocinas podría ser debido a que la mayoría de los estudios relacionados con los efectos de las hormonas esteroides sobre el sistema inmunológico se han enfocado a infiltrados celulares en modelos como el endometrio, fluidos peritoneales u otros tejidos reproductivos [34, 37, 52, 60]. Además, los principales efectos observados de las hormonas esteroides sobre las células del sistema inmunológico son en aquellas condiciones en que se mimetizan las concentraciones observadas durante el embarazo o las reportadas en la interface materno-fetal, así como en subtipos celulares bien definidos [61, 62] a diferencia de nuestro estudio donde se realizaron en una población de células como son las PBMC.

En la actualidad la PRL es considerada como una citocina por compartir muchas de las características con esta familia de proteínas [15]. La activación de las PBMC por acción a diferentes agentes, incluyendo a la Con-A, facilita el estudio de las citocinas sobre estas células. A este respecto, los efectos de las hormonas esteroides observados sobre el sistema inmunológico son más evidentes en procesos inflamatorios o autoinmunes cuando las células se encuentran en un estado activo [61, 62]. Nuestros resultados mostraron que la activación de las PBMC con la Con-A inhibió la expresión génica de la *PRL*, mientras que aumentó la expresión de las citocinas IL2, IFNG e IL10, independientemente de las fases del ciclo menstrual. En estudios previos han

informado que la relación Th1/Th2 cambia a lo largo del ciclo menstrual. Mientras que la respuesta de tipo Th1 se favorece durante la fase folicular, este perfil cambia durante la fase lútea a una respuesta de tipo Th2 [33]. De esta manera, citocinas como IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se expresan en mayor proporción durante la fase folicular y citocinas como la IL-4 y miembros de la familia del FGF $\beta$  se expresan principalmente en la fase lútea. Sin embargo, existen citocinas como la IL-2 que no se modifican durante el ciclo menstrual [33, 53, 60]. En el presente trabajo de tesis no se observaron cambios significativos en la expresión génica de las citocinas durante las fases del ciclo menstrual tanto en PBMC activadas como no activadas con la Con-A. En estudios *in vitro* realizados en PBMC y linfocitos humanos se ha observado que las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-4 inhiben la expresión génica de la *PRL* en células de sangre periférica [27] a diferencia del IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  que la inhiben en las células endometriales y células de la decidua, respectivamente [63, 64]. Asimismo, la IL-10 inhibe la proliferación inducida por la *PRL* en los timocitos [65]. La activación de las PBMC por acción de la Con-A conlleva a un aumento en la expresión de estas y otras citocinas, tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, por lo que los efectos observados sobre la expresión del gen de la *PRL* por esta lectina podrían ser secundarios al aumento de citocinas que regulan la expresión de la *PRL* linfocitaria. En nuestro estudio, la IL-2 fue la citocina con mayor respuesta a la estimulación con Con-A en los cultivos de PBMC, mientras que las concentraciones de esta citocina determinadas en los medios de estos cultivos correlacionaron de manera negativa con la expresión del gen de la *PRL*. Estos resultados sugieren que la IL-2 podría estar implicada en los efectos inhibitorios de la Con-A sobre la expresión génica de la *PRL* linfocitaria. Este hallazgo se reforzó con la adición de un anticuerpo específico contra la IL-2 que revirtió de manera parcial, pero significativa, los efectos de esta lectina sobre la expresión génica de la *PRL*. Aún faltan estudios para dilucidar el o los mecanismos por los cuales la Con-A inhibe la expresión génica de la *PRL*, así como las vías de señalización involucradas en este proceso. Debido a que solo el 40% de las concentraciones de la IL-2 secretada a los medios de cultivo explican la disminución de la expresión de la *PRL* por la acción de la Con-A, no se descarta la participación de otras citocinas como la IL-4 que pudieran estar involucradas en los efectos inhibidores de la Con-A sobre esta hormona-citocina. Aún

cuando el AMPc es el principal regulador de la expresión génica de la *PRL* en las PBMC y linfocitos [25], los resultados de nuestro trabajo sugieren que la Con-A no activa esta vía debido a que esta lectina, al igual que la IL-2, no modificó las concentraciones intracelulares del AMPc. Esto sugiere que vías independientes a este segundo mensajero podrían estar involucradas en el efecto de la Con-A sobre la expresión de la *PRL* linfocitaria. A este respecto, se ha informado que el promotor superdistal de la *PRL*, encargado de su regulación en los linfocitos, tiene elementos de respuesta para las proteínas STATs y estas secuencias son funcionales en las células leucocitarias [17]. Esta vía es activada por los receptores de la súper familia de citocinas clase I, incluyendo a las citocinas IL-2 e IL-4 que regulan a la *PRL* y que aumentan su expresión son sobre reguladas por la Con-A. Por lo tanto, esto implicaría que la Con A podría regular a la *PRL* linfocitaria de manera indirecta al aumentar la secreción de estas dos citocinas a través de la activación de la vía de señalización JAK/STAT. Otro factor de transcripción importante en la regulación de *PRL* linfocitaria es el factor de transcripción NFkB, que regula la respuesta inmunológica en estados de estrés e infecciones. Los elementos de respuesta para este factor de transcripción están presentes en el promotor superdistal de la *PRL*. Es importante subrayar que los efectos de la *PRL* sobre el sistema inmunológico se han observado principalmente en condiciones de estrés, así como en condiciones de infección [8], lo que sugiere que la regulación del gen de la *PRL* solo se da en ciertas condiciones en las células del sistema inmunológico. Por último y de manera adicional, mediante las técnicas de cuantificación de RNA y de genes reporteros se ha demostrado que el gen de la *PRL* tiene patrones altamente variables de expresión debido a su compleja regulación tejido-específico y por la actividad de sus promotores en diferentes condiciones fisiológicas, incluyendo a los factores de transcripción presentes en los diferentes tipos celulares [17].

## 8. Conclusiones

Los resultados de este estudio permitieron demostrar la ausencia de efectos durante el ciclo menstrual sobre la expresión génica de la PRL en las PBMC y sugiere que cambios en la expresión diferencial de citocinas podrían contribuir a la regulación del promotor superdistal de esta hormona.

Éste es el primer estudio donde se describe que la activación de las PBMC por la Con-A disminuye la expresión del gen de la *PRL* en estas células. Estos resultados son importantes porque podrían explicar el aumento en las concentraciones circulantes de la PRL observadas en pacientes afectados con LEG, debido a que estos pacientes cursan con bajas concentraciones de IL-2 y ambas condiciones se han asociado con la actividad de esta enfermedad [66, 67].

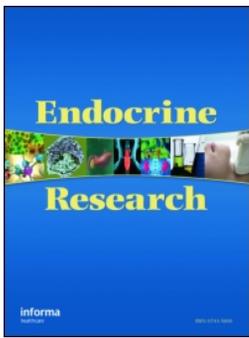
## 9. Literatura citada

1. Ben-Jonathan, N., et al., *Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects*. Endocr Rev, 1996. **17**(6): p. 639-69.
2. Bole-Feysot, C., et al., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. Endocr Rev, 1998. **19**(3): p. 225-68.
3. Ignacak, A., et al., *Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone*. J Physiol Pharmacol. **63**(5): p. 435-43.
4. Freeman, M.E., et al., *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1523-631.
5. Clapp, C., L. Martinez de la Escalera, and G. Martinez de la Escalera, *Prolactin and blood vessels: a comparative endocrinology perspective*. Gen Comp Endocrinol. **176**(3): p. 336-40.
6. Buckley, A.R., *Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 684-90.
7. Fojtikova, M., M. Cerna, and K. Pavelka, *[A review of the effects of prolactin hormone and cytokine on the development and pathogenesis of autoimmune diseases]*. Vnitr Lek. **56**(5): p. 402-13.
8. Dorshkind, K. and N.D. Horseman, *The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency*. Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 292-312.
9. Matera, L., M. Mori, and A. Galetto, *Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 728-34.
10. Orbach, H., et al., *Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients*. Clin Rev Allergy Immunol. **42**(2): p. 189-98.
11. Shelly, S., M. Boaz, and H. Orbach, *Prolactin and autoimmunity*. Autoimmun Rev. **11**(6-7): p. A465-70.
12. Leanos-Miranda, A., et al., *Anti-prolactin autoantibodies in pregnant women with systemic lupus erythematosus: maternal and fetal outcome*. Lupus, 2007. **16**(5): p. 342-9.
13. Carreno, P.C., et al., *Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells*. J Neuroimmunol, 2004. **153**(1-2): p. 83-90.
14. Chavez-Rueda, K., et al., *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, 2005. **116**(2): p. 182-91.
15. Dogusan, Z., et al., *Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes*. J Neuroimmunol, 2001. **120**(1-2): p. 58-66.
16. Berwaer, M., J.A. Martial, and J.R. Davis, *Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(5): p. 635-42.
17. Featherstone, K., M.R. White, and J.R. Davis, *The Prolactin Gene: A Paradigm of Tissue Specific Gene Regulation with Complex Temporal Transcription Dynamics*. J Neuroendocrinol.
18. Duan, R., E. Ginsburg, and B.K. Vonderhaar, *Estrogen stimulates transcription from the human prolactin distal promoter through AP1 and estrogen responsive elements in T47D human breast cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **281**(1-2): p. 9-18.
19. Gellersen, B., et al., *Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(3): p. 356-73.
20. Ben-Jonathan, N., C.R. LaPensee, and E.W. LaPensee, *What can we learn from rodents about prolactin in humans?* Endocr Rev, 2008. **29**(1): p. 1-41.

21. Ben-Jonathan, N. and R. Hnasko, *Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(6): p. 724-63.
22. Petty, R.G., *Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action*. *Schizophr Res*, 1999. **35 Suppl**: p. S67-73.
23. Watters, J.J., et al., *Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(11): p. 1872-81.
24. Gerlo, S., et al., *Mechanism of prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>-induced prolactin expression in human T cells: cooperation of two PGE<sub>2</sub> receptor subtypes, E-prostanoid (EP) 3 and EP<sub>4</sub>, via calcium- and cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated signaling pathways*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 5952-62.
25. Gerlo, S., et al., *Multiple cAMP-induced signaling cascades regulate prolactin expression in T cells*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(1): p. 92-9.
26. Brosens, J.J., N. Hayashi, and J.O. White, *Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells*. *Endocrinology*, 1999. **140**(10): p. 4809-20.
27. Gerlo, S., et al., *Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines*. *J Neuroimmunol*, 2005. **162**(1-2): p. 190-3.
28. Quintero, O.L., et al., *Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity*. *J Autoimmun*. **38**(2-3): p. J109-19.
29. Shoenfeld, Y., A. Tincani, and M.E. Gershwin, *Sex gender and autoimmunity*. *J Autoimmun*. **38**(2-3): p. J71-3.
30. Tait, A.S., C.L. Butts, and E.M. Sternberg, *The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(4): p. 924-31.
31. Henriot, P., H.P. Gaide Chevronnay, and E. Marbaix, *The endocrine and paracrine control of menstruation*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **358**(2): p. 197-207.
32. Trombetta, A.C., M. Meroni, and M. Cutolo, *Steroids and Autoimmunity*. *Front Horm Res*, 2017. **48**: p. 121-132.
33. Ma, H., et al., *Altered cytokine gene expression in peripheral blood monocytes across the menstrual cycle in primary dysmenorrhea: a case-control study*. *PLoS One*. **8**(2): p. e55200.
34. King, A.E. and H.O. Critchley, *Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **120**(2-3): p. 116-26.
35. Beagley, K.W. and C.M. Gockel, *Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003. **38**(1): p. 13-22.
36. Castro-Caldas, M., et al., *Dexamethasone-induced and estradiol-induced CREB activation and annexin 1 expression in CCRF-CEM lymphoblastic cells: evidence for the involvement of cAMP and p38 MAPK*. *Mediators Inflamm*, 2003. **12**(6): p. 329-37.
37. Druckmann, R. and M.A. Druckmann, *Progesterone and the immunology of pregnancy*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. **97**(5): p. 389-96.
38. Nagy, E. and I. Berczi, *Immunodeficiency in hypophysectomized rats*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1978. **89**(3): p. 530-7.
39. Nagy, E. and I. Berczi, *Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival*. *Endocrinology*, 1991. **128**(6): p. 2776-84.
40. Vidaller, A., et al., *Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient*. *J Clin Immunol*, 1992. **12**(3): p. 210-5.
41. Goffin, V., et al., *Prolactin: the new biology of an old hormone*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 47-67.

42. Kochendoerfer, S.K., et al., *Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 265-73.
43. Krishnan, N., et al., *Prolactin-regulated pim-1 transcription: identification of critical promoter elements and Akt signaling*. Endocrine, 2003. **20**(1-2): p. 123-30.
44. Krishnan, N., et al., *Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo*. Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 2102-10.
45. Pellegrini, I., et al., *Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(7): p. 1023-31.
46. McMurray, R.W., *Prolactin in murine systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 742-7.
47. Peeva, E., et al., *Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(5): p. 310-9.
48. Peeva, E., et al., *Cutting edge: lupus susceptibility interval Sle3/5 confers responsiveness to prolactin in C57BL/6 mice*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1401-5.
49. Walker, S.E., *Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 762-8.
50. Mendez, I., et al., *Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin*. Lupus, 2004. **13**(1): p. 45-53.
51. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
52. Sikora, J., et al., *Peripheral blood proinflammatory response in women during menstrual cycle and endometriosis*. Cytokine. **76**(2): p. 117-22.
53. Priyanka, H.P., et al., *Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women*. Brain Behav Immun. **32**: p. 131-43.
54. Tanner, M.J., N.C. Hadlow, and R. Wardrop, *Variation of female prolactin levels with menopausal status and phase of menstrual cycle*. Aust N Z J Obstet Gynaecol. **51**(4): p. 321-4.
55. Zinger, M., M. McFarland, and N. Ben-Jonathan, *Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(2): p. 689-96.
56. Dosiou, C., et al., *Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone*. J Endocrinol, 2008. **196**(1): p. 67-77.
57. Hughes, G.C., *Progesterone and autoimmune disease*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(6-7): p. A502-14.
58. Pierdominici, M., et al., *Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes*. Immunol Lett. **132**(1-2): p. 79-85.
59. Gameiro, C.M., F. Romao, and C. Castelo-Branco, *Menopause and aging: changes in the immune system--a review*. Maturitas. **67**(4): p. 316-20.
60. Omu, A.E., et al., *Differential expression of T-helper cytokines in the peritoneal fluid of women with normal ovarian cycle compared with women with chronic anovulation*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003. **82**(7): p. 603-9.
61. Lissauer, D., et al., *Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile*. Eur J Immunol. **45**(10): p. 2858-72.
62. Xiu, F., et al., *High Physiological Concentrations of Progesterone Reverse Estradiol-Mediated Changes in Differentiation and Functions of Bone Marrow Derived Dendritic Cells*. PLoS One. **11**(4): p. e0153304.
63. Christian, M., et al., *Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells*. Endocrinology, 2001. **142**(7): p. 3142-51.

64. Jikihara, H. and S. Handwerger, *Tumor necrosis factor-alpha inhibits the synthesis and release of human decidua prolactin*. *Endocrinology*, 1994. **134**(1): p. 353-7.
65. Roy, T., et al., *Tumor associated release of interleukin-10 alters the prolactin receptor and down-regulates prolactin responsiveness of immature cortical thymocytes*. *J Neuroimmunol*, 2007. **186**(1-2): p. 112-20.
66. Cardenas-Mondragon, G., et al., *Elevated serum bioactive prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity as disclosed by homologous receptor bioassays*. *J Rheumatol*, 2007. **34**(7): p. 1514-21.
67. Alcocer-Varela, J. and D. Alarcon-Segovia, *Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 1982. **69**(6): p. 1388-92.



# The role of the ovarian cycle and the effects of mitogen-induced cytokines on human prolactin gene expression in peripheral blood mononuclear cells

Leticia González, Saúl Lira-Albarrán, Isabel Méndez, Lorenza Díaz & Fernando Larrea

To cite this article: Leticia González, Saúl Lira-Albarrán, Isabel Méndez, Lorenza Díaz & Fernando Larrea (2017): The role of the ovarian cycle and the effects of mitogen-induced cytokines on human prolactin gene expression in peripheral blood mononuclear cells, Endocrine Research, DOI: [10.1080/07435800.2017.1374967](https://doi.org/10.1080/07435800.2017.1374967)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/07435800.2017.1374967>

View supplementary material [↗](#)

Published online: 03 Oct 2017.

Submit your article to this journal [↗](#)

Article views: 12

View related articles [↗](#)

View Crossmark data [↗](#)



# The role of the ovarian cycle and the effects of mitogen-induced cytokines on human prolactin gene expression in peripheral blood mononuclear cells

Leticia González<sup>a,b</sup>, Saúl Lira-Albarrán<sup>a</sup>, Isabel Méndez<sup>c</sup>, Lorenza Díaz<sup>a</sup>, and Fernando Larrea<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; <sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México; <sup>c</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

## ABSTRACT

**Background:** little is known on the influences of normal menstrual cycle on prolactin gene expression in immune cells. Aim of the study: to determine the effects of the ovarian cycle on prolactin and its receptor expression. **Methods:** peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from twenty-six normal menstruating women at different intervals of their menstrual cycle. The PBMC were incubated during 24 h in the presence or absence of Concanavalin-A (Con-A) and the gene expression of *PRL*, *PRLR* and cytokines was evaluated by qPCR. Prolactin, IL-2 and cAMP were determined in each culture by specific immunoassays. **Results:** neither *PRL* nor its receptor expression in PBMC changed significantly among groups, including the cytokines (IL-2, IL-10, and IFNG) studied. Similar results, among groups, were obtained, when *PRL* expression was stimulated by PGE2 or 8-Br-cAMP. Concanavalin A-stimulated PBMC expressed significantly less prolactin and a significant negative correlation between secreted IL-2 and PRL expression was found. The presence of anti-IL-2 antibodies in Con-A stimulated-cultures significantly increased *PRL* expression when compared to control cells regardless the hormonal status. **Conclusions:** these data suggest that the menstrual cycle does not significantly modulate or influence prolactin and cytokines gene expression in PBMC, and indicate that *IL-2* may be involved in the Con-A regulation of *PRL* expression in immune cells.

## ARTICLE HISTORY

Received 15 February 2017  
Revised 14 August 2017  
Accepted 30 August 2017

## KEYWORDS

*PRL* expression; immune-derived prolactin; menstrual cycle; lymphocytes; Concanavalin-A

## Introduction

It is well known that the immune regulation differs between women and men<sup>1,2</sup> and this includes the prevalence of a number of diseases.<sup>3</sup> In fact, fertile women are more prone to autoimmune disorders than men.<sup>4,5</sup> The precise mechanism leading to this gender bias is still poorly understood; however, accumulating evidence suggests that both innate and adaptive immune responses vary in women along the menstrual cycle.<sup>6,7</sup> In this regard, the menstrual cycle represents a physiological condition, where the important changes in pituitary and ovarian hormones take place that could affect immune activity, as has been previously shown.<sup>8</sup> Most of these changes are probably mediated by hormones produced cyclically by the ovary, such as estrogen (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>) or by the pituitary via prolactin (PRL). To the best of our knowledge, changes in PRL secretion by the pituitary have not been consistently recognized within

the menstrual cycle. The majority of studies, although limited, agreed that serum PRL levels are significantly higher during the periovulatory and the luteal phase and a positive correlation between E<sub>2</sub> and prolactin serum levels has also been found.<sup>9–11</sup> Most of the circulating PRL is derived from the pituitary gland; however, there are a number of extra pituitary sources where prolactin is expressed and secreted.<sup>12</sup> Among these, immune cells express the so-called lymphocyte-derived PRL under the control of a super distal, cell-specific and independent of Pit-1 promoter.<sup>13,14</sup> Nowadays, lymphocyte PRL is considered as an immune cell-derived and structurally related cytokine.<sup>15</sup> Indeed, mild to moderate elevations of serum PRL have been found in the female subjects affected with systemic lupus erythematosus (SLE), including an increase in PRL production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC).<sup>16–22</sup> There is information that supports

the role of PRL in the immune system, particularly in SLE where this hormone increases the ability of autoreactive B-lymphocytes to produce auto-antibodies.<sup>23,24</sup> However, little if any information exists on the pattern and mechanism that control PRL expression in PBMC obtained from normal or immune compromised women. Therefore, herein, we have analyzed the pattern of PRL and its receptor (PRLR) expression in Concanavalin A (Con-A)-stimulated and non-stimulated PBMC from healthy women during different phases of their menstrual cycle, including experimental studies designed towards the description of some of the regulatory factors that may contribute to PRL expression in these cells.

## Material and methods

### Materials

Con-A, 8-Br-cAMP and PGE2 (PubChem CID: 5280360) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis Missouri, USA) and human recombinant interleukin-2 (IL-2) from Roche Applied Science (Mannheim Germany). Anti-human IL-2 was obtained from BioLegend Inc (San Diego, CA). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for human interleukin IL-2 was purchased from R&D systems Inc. (Minneapolis USA) and the anti-cAMP rabbit pAb for radioimmunoassay was obtained from Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA). All other reagents used were of analytical grade.

### Subjects

The study protocol was approved by the Human Ethical Research Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and the Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. A written informed consent was obtained from all subjects who volunteered to participate in this study.

Twenty-six normal menstruating women (19–40 years old) were invited to participate in this study. All volunteers were followed longitudinally along the menstrual cycle. None of the subjects had history of endocrine or/and immune disease or receiving drugs known to be associated with

increased PRL secretion, including contraceptives for at least 3 months before the beginning of the study. In all women, after a 10–12 hour overnight fast, three blood samples (30 ml) were taken from the antecubital vein at different intervals of the cycle between 08:00 and 09:00 h. Cycle was divided into three phases, phase one (days 1 to 5), phase 2 (days 10–12) and phase 3 (days 21–23) taken as day one the first day of bleeding. After serum E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> determinations, women were arranged within the following group criteria: group I : women with low E<sub>2</sub> (<53.3 pg/ml) and P<sub>4</sub> (<1 ng/ml) levels; group II: women with high E<sub>2</sub> (>53.3 pg/ml) and low P<sub>4</sub> (<1 ng/ml), and group III: women with high levels (E<sub>2</sub> > 53.3 pg/ml; P<sub>4</sub> > 3.7 ng/ml) of both hormones.

### Cell preparation and cultures

The PBMC were obtained using Lymphoprep™ (Axis Shield, Oslo, Norway) from EDTA-treated venous blood for gradient centrifugation at 800 g at room temperature for 30 min. The PBMC recovered from the interphase were washed twice with phosphate-buffered saline and suspended ( $1 \times 10^6$  cells/ml) in serum-free culture medium (AIM-V, GIBCO; Grand Island, NY), as previously described.<sup>17</sup> Viability of cells, as determined by Trypan blue exclusion, was always above 95%. Isolated PBMC were incubated in the presence or absence of Con-A (1 µg/ml) at 37°C in 95% air/5% CO<sub>2</sub> under 95% humidity. At the end of incubation period (24 h), culture medium was obtained by centrifugation and kept at –70°C until assayed and cells prepared for RNA extraction.

### PCR amplifications

Total RNA was isolated from cultured PBMC, as described by Chomczynski and Sacchi<sup>25</sup>, using the TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA concentration was assessed using ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a constant amount of 1µg total RNA was reverse transcribed using a reverse transcription assay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Identical PCR conditions were performed for all genes and gene expression data was normalized to the ribosomal unit L-32 (RPL32)

used as a housekeeping gene. The oligonucleotides used to amplify every gene were designed with the on-line software of Roche (Universal Probe Library Assay Design Center, Roche, <https://www.roche-applied-science.com>), and the sequences verified by BLAST. The primer sequences for all the genes that were amplified are shown in Supplement Table 1. Amplifications were carried on the LightCycler 2.0 real-time PCR instrument (Roche, Diagnostic, Mannheim, Germany) using the Roche Master Mix in combination with the corresponding hydrolysis probe (Roche, Universal Probe Library). Relative gene expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, normalized to *RPL32*. For each experimental condition, mRNA levels were determined in at least four independent experiments, each in triplicate.

### Hormone and cAMP assays

Blood samples taken were allowed to clot at room temperature, centrifuged at 1000 g and supernatants stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed. Prolactin was measured in triplicate by immunoradiometric assay (IRMA) (Izotop, Budapest). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were 2.0% and 6.0%, respectively. Serum  $\text{E}_2$  and  $\text{P}_4$  concentrations were measured in triplicate by specific enzyme immunoassays (DRG Instruments, Germany and Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynne, UK, respectively). The intra- and inter-assay CVs for  $\text{E}_2$  were 6.71% and 7.48% and for  $\text{P}_4$  7.54% and 8.46%, respectively. These CVs were calculated from pools of standard sera at the average hormone concentrations of 150 pg/mL and 5 ng/mL, respectively. IL-2 measurements were performed by ELISA according to the manufacturer instructions. Intracellular cAMP was measured in acetylated samples by radioimmunoassay, whose sensitivity

and the inter- and intra-assay CVs have been previously described.<sup>26</sup>

### Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the parametric distribution of data. Analysis of variance, followed by a Tukey-Kramer test was used to establish statistical significance among groups. Non-parametric tests were used as appropriate. Correlations were evaluated with Spearman or Pearson's test according with the distribution of the data. All data were presented as mean  $\pm$  SEM. A p value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Data analysis was performed with NCSS (NCSS, Kaysville, Utah, USA).

## Results

### Serum PRL and gene expression profiles of PRL, PRLR and cytokines in PBMC from normal women during different stages of the menstrual cycle

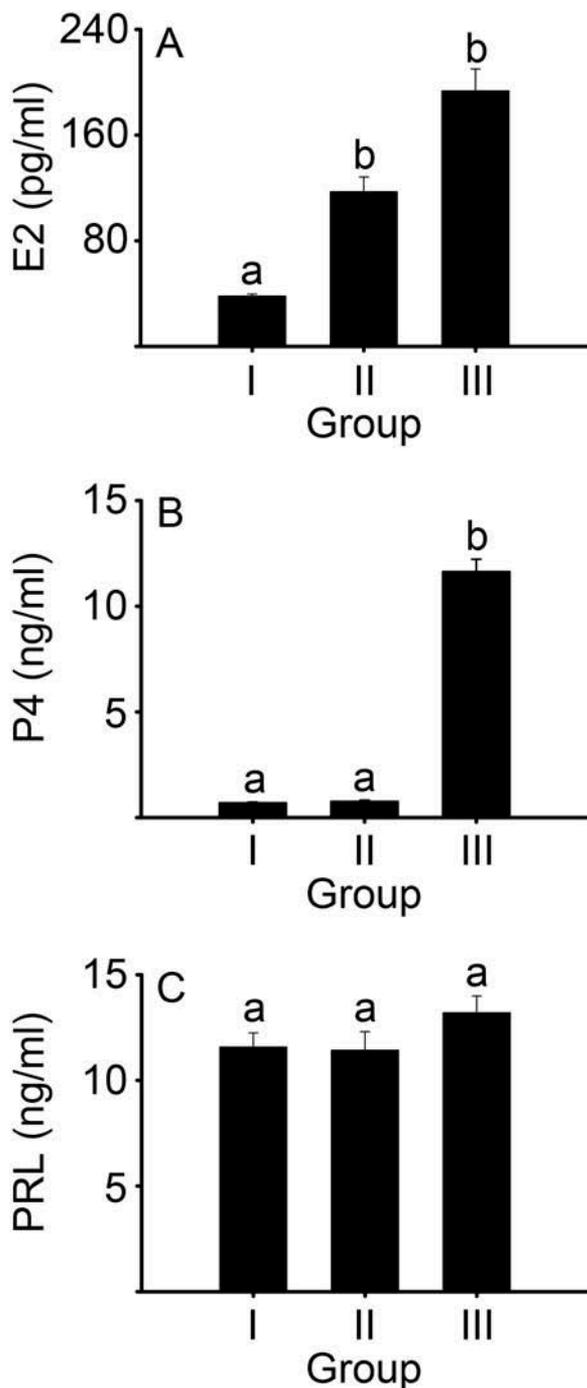
As mentioned under Material and Methods, blood samples were obtained from normal women for hormone determinations and PBMC separation, respectively. Estradiol and  $\text{P}_4$  were assayed in each serum sample in order to confirm the appropriate allocation within menstrual phase of the cycle as described under Material and Methods. From the twenty-six original subjects in each group, all met the criteria to be included in Group I, only 19 in Group II and 20 in Group III. All the subjects that did not meet the criteria were excluded from the group.

The hormone levels in each group are presented in Figure 1. Only those samples from women that presented a menstrual bleeding at the expected time within the studied cycle were included. As depicted in Figure 1, Panel C, serum PRL levels were similar

**Table 1.** PRL and cytokines gene expression in basal and Con-A stimulated PBMC.

Gene	Group I		Group II		Group III	
	Basal	Con-A	Basal	Con-A	Basal	Con-A
<i>PRL</i>	3.88 $\pm$ 0.66	1.02 $\pm$ 0.27*	5.44 $\pm$ 1.04	1.28 $\pm$ 0.26*	4.09 $\pm$ 1.11	1.26 $\pm$ 0.38*
<i>PRLR</i>	0.76 $\pm$ 0.29	0.36 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.16	0.42 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.44	0.59 $\pm$ 0.19
<i>IL2</i>	1.12 $\pm$ 0.20	122 $\pm$ 35.7*	1.12 $\pm$ 0.24	114 $\pm$ 25.7*	1.34 $\pm$ 0.43	119 $\pm$ 31.5*
<i>IFNG</i>	13.3 $\pm$ 2.46	510 $\pm$ 151*	16.2 $\pm$ 3.18	487 $\pm$ 85.1*	17.1 $\pm$ 3.40	607 $\pm$ 219*
<i>IL10</i>	6.06 $\pm$ 1.97	18.5 $\pm$ 4.78*	5.29 $\pm$ 1.65	17.3 $\pm$ 5.11*	11.3 $\pm$ 3.67	21.6 $\pm$ 5.20*

*PRL*: Prolactin, *PRLR*: prolactin receptor, *IL*: interleukin 2, *IFNG*: interferon gamma, *IL10*: interleukin 10. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM  $\times 10^4$  of relative gene concentration ratio (target gene /*RPL32*), Basal: non-stimulated-Con-A, Con-A: Concanavalin A. \*p  $< 0.05$  versus Basal.



**Figure 1.** Estradiol (E2), progesterone (P4) and prolactin (PRL) serum concentrations in the different groups studied. Each serum sample from women with normal menstrual cycles was confirmed to belong to one of the three groups assigned based on the serum levels of E2 and P4. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM. GI (n=26), GII (n=19) and GIII (n= 20).  $p < 0.001$  for bars labeled with different letters.

and without significant differences among the groups. Similar results were obtained in PBMC when *PRL* and *PRLR* expression was evaluated under basal non-stimulated Con-A conditions

(Table 1). Although no statistical fluctuations of serum PRL and its basal gene expression in PBMC in the menstrual cycle were found, their correlation with hormone serum concentrations was evaluated. The results showed that neither serum PRL levels nor *PRL* and *PRLR* expression had any significant correlation with E<sub>2</sub> or P<sub>4</sub> in serum. Furthermore, when Con-A and non-Con-A stimulated PBMC were incubated with serum samples (5% final dilution), belonging to the three groups studied, no significant changes on PRL gene expression were observed regardless the hormone content in the serum (data not shown).

Since *PRL* expression in immune cells is regulated by cytokines and through this mechanism lymphocytes could influence PRL release and/or activity in the immune system, we therefore investigated the gene expression pattern of Th1 cytokines (*IL2* and *IFNG*) and Th2 cytokine (*IL10*) in PBMC from the different groups. Table 1 shows the comparison of gene expression levels of Th1 and Th2 cytokines in basal and Con-A stimulated PBMC. As can be seen, none of the cytokines studied showed statistically significant changes when compared among groups in both basal and Con-A stimulated lymphocytes; however, and with the exception of *PRL* and *PRLR*, cytokines gene expression in Con-A activated cells, as expected, increased significantly. *IL2* expression showed the major increase, among the cytokines studied, in the presence of Con-A. In the case of *PRL*, Con A-stimulation induced a significant 4-fold inhibitory effect on gene expression in all groups with no statistical significance among them (Table 1). Incubations in the presence of increasing concentrations of Con-A resulted in cell proliferation as determined by the colorimetric XTT assay (Supplement Figure 1).

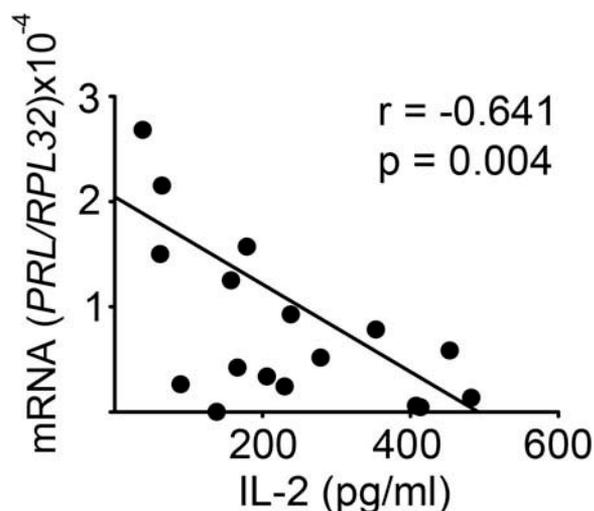
#### **Effect of camp on PRL expression in the different groups**

Since PGE2 and  $\beta$ -adrenergic agonists are natural stimulators of *PRL* expression in human lymphocytes, we wanted to know whether PBMC obtained at different intervals of the menstrual cycle and incubated in the presence of the adenylate cyclase stimulator PGE2 or 8-Br-cAMP differed in their ability to respond in terms of *PRL* expression.

When isolated non Con-A-stimulated PBMC from the different groups were cultured in the absence (basal) or presence of PGE<sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-6}$  M) or 8-Br-cAMP ( $1 \times 10^{-3}$  M), both compounds increased *PRL* expression ( $1.65 \pm 0.17$  and  $2.13 \pm 0.24$  folds over basal, respectively), with no statistically inter-group differences (data not shown).

### ***PRL* expression regulation in Con-A-stimulated PBMC**

As mentioned above, Con-A stimulated PBMC expressed significantly less *PRL* mRNA than those under basal conditions. These results suggest that Con-A, directly or through other Con-A stimulated factor may affect *PRL* expression at the level of transcription. Initially, we wanted to investigate the correlation between secreted IL-2 into the media with *PRL* expression in cultured Con-A-stimulated PBMC. IL-2 was chosen since this cytokine was, among those studied, the most stimulated by Con-A. As shown in Figure 2, a significant negative correlation coefficient ( $r = -0.641$ ,  $p = 0.004$ ) was observed when IL-2 secreted in the culture media was compared to *PRL* expression in cultured Con-A-stimulated PBMC. In a similar manner, addition of increasing concentrations of IL-2 to PBMC decreased in a significant

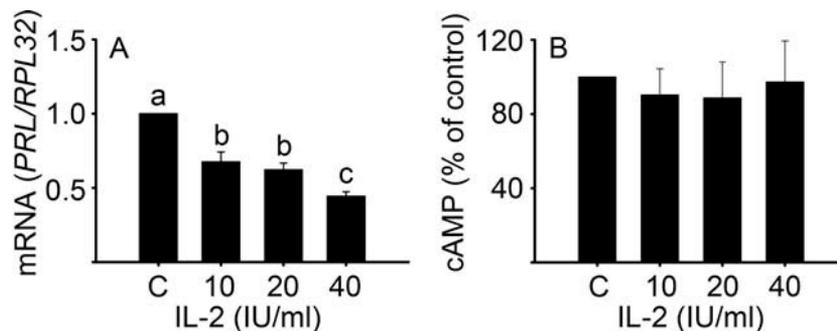


**Figure 2.** Correlation between secreted IL-2 and *PRL* expression from Con-A stimulated PBMC cultures. PBMC from 17 donors were kept in culture during 24 h and *PRL* expression was quantified by RT-qPCR and results normalized to RPL32. IL-2 was measured in culture media by enzyme immunosorbent assay.

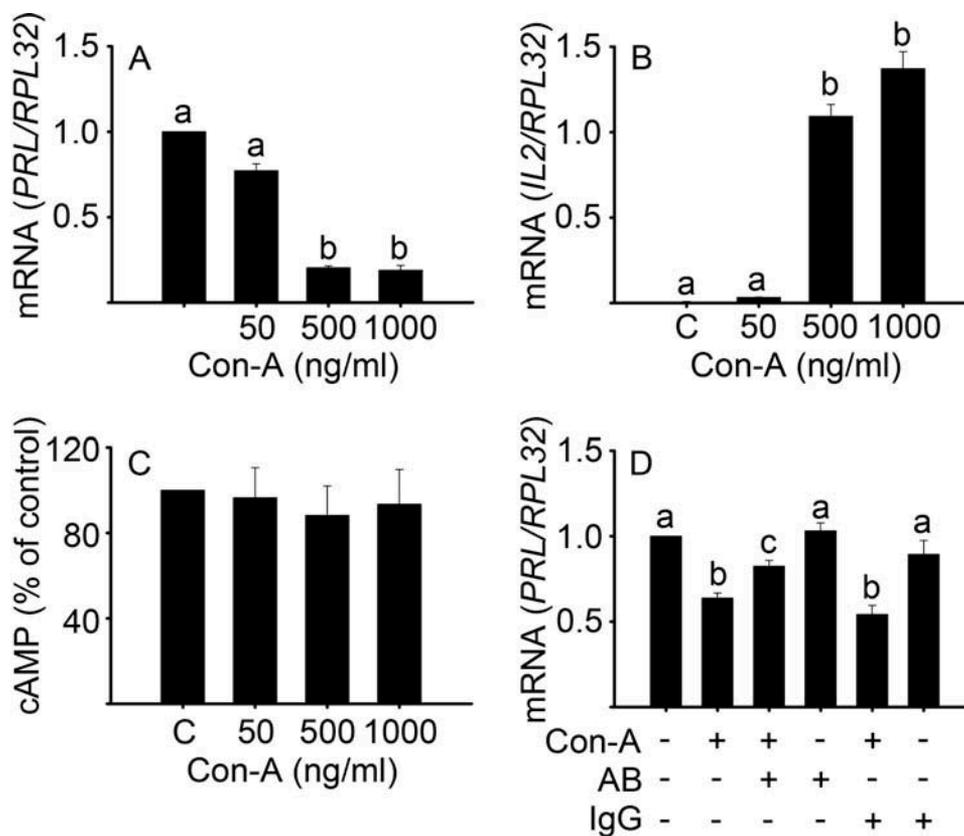
manner *PRL* expression (Figure 3, Panel A). This effect was not accompanied by a significant change in the concentrations of intracellular cAMP (Figure 3, Panel B). In addition, we studied the effects of different Con-A concentrations on *PRL* and *IL-2* expression in PBMC. As depicted in Figure 4, statistically significant inhibition (Panel A) and stimulation (Panel B) of *PRL* and *IL-2* expression, respectively were observed. This effect was most probably not cAMP mediated since there were not statistically significant changes in intracellular cAMP (Panel C); however, the presence of a specific anti-IL-2 antibody in Con-A stimulated cultures significantly increased *PRL* expression when compared to that incubated only in the presence of Con-A (Panel D). This effect was not observed when cells were incubated in the presence of hyperimmune rabbit serum.

### **Discussion**

It is notorious the lack of information on the effects of the menstrual cycle on different physiological conditions, particularly those concerning the immune system. Regarding this, it is known that *PRL* is synthesized and secreted by immune cells and nowadays, *PRL* is considered as an immune regulatory cytokine; however, little is known about the physiological effects that hormonal fluctuations occurring during the cycle might have on immune *PRL* and *PRLR* expression. In a similar manner, information is missing on the relationship between *PRL* and other cytokines, particularly in terms of their gene expression patterns in PBMC from women at different stages of the menstrual cycle. Freshly, the isolated PBMC were used in all the experiments, since freezing and thawing of cryopreserved cells may lead to changes in the cytokine pattern.<sup>27</sup> In the present study, there were no significant changes along the cycle in both *PRL* and *PRLR* expression profile and Th1- and Th2-cytokines in both stimulated- and non-stimulated Con-A immune cells. These observations are of interest since to date there is little if any information helping to establish the role of the ovarian cycle on the immune system in normal women. In this regard, a cycle-dependent increase on immunoglobulin-secreting cells from normal women was



**Figure 3.** Effects of recombinant human IL-2 on PRL expression (A) and intracellular cAMP levels (B) in PBMC cultures. PBMC were stimulated for 24 h in the presence of increasing doses of IL-2. PRL expression was quantified by RT-qPCR and results normalized to RPL32. Control values were set to one. Intracellular concentrations of cAMP were measured by specific radioimmunoassay and results expressed as percent of control. The results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent donors, each in triplicate.  $p < 0.05$  for bars labeled with different letters.



**Figure 4.** Effects of Con-A on PRL (A), IL-2 (B) expression and intracellular cAMP levels (C). PRL expression was also evaluated in cells stimulated with 1  $\mu$ g of Con-A in the presence or absence (IgG) of an anti-IL-2 antibody (D). PBMC were stimulated with Con-A at different concentrations for 24 h. PRL and IL-2 expression were quantified by RT-qPCR and results normalized to RPL32. Intracellular concentrations of cAMP were measured by specific radioimmunoassay and results expressed as the percent of control. The results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent donors, each in triplicate.  $p < 0.05$  for bars labeled with different letters.

observed<sup>1</sup>, suggesting a regulatory role of endogenous steroids; however, in another study, no changes on cytokine production were found during the luteal phase.<sup>28</sup> These and our results might challenge the role of ovarian steroids as

determinant for gender differences found in immune responses. In a similar manner, our finding that PBMC responded equally to known regulators of PRL expression, such as PGE2 and cAMP, regardless the stage of the menstrual cycle,

suggests that the hormonal changes occurring in this condition might not be involved in *PRL* expression by immune cells. These results agreed with those showing that the  $E_2$  or  $P_4$  did not affect, *in vitro*, the production of cytokines in PBMC from post-menopausal women.<sup>28,29</sup> Taken together, these data allowed us to conclude that neither  $E_2$  nor  $P_4$ , including synthetic hormones, significantly influence cytokine production by PBMC. This, however, needs further investigation.

An interesting observation in this study was the finding that in the presence of Con-A, and independently of the stage of the cycle, PBMC significantly expressed less *PRL* when compared to control cells. This finding was only seen with *PRL*, but not with any other of the cytokines studied. Another important observation was the fact, that the effects of Con-A on *PRL* expression or on the other cytokines were not accompanied by changes in the concentration of intracellular cAMP. To our knowledge, this is the first report showing a down-regulatory effect of Con-A on *PRL* expression, which contrasts to the effects on protein secretion by cells incubated in the presence of the lectin.<sup>13</sup> This inhibitory effect could partially be explained by the modulation of *PRL* expression by other cytokines in Con-A-stimulated-PBMC. In this study IL-2, a Th1 cytokine, was the most stimulated cytokine at the gene transcription level by Con-A and a high statistically significant negative correlation was observed between secreted IL-2 and *PRL* expression. This correlation was further supported by our results in the cultures of PBMC incubated in the presence of increasing concentrations of exogenous recombinant IL-2, and in those Con-A-stimulated in the presence of anti-IL2 antibody. These results suggest that the Con-A inhibited indirectly *PRL* expression in PBMC through an autocrine enhancing effect on *IL-2* gene and protein expression. The mechanism by which Con-A affects lymphocyte stimulation has been established<sup>30</sup> and a modest although no significant increase in cAMP has been observed.<sup>31</sup> These observations agreed with the results presented herein in the sense that Con-A stimulation did not modify cAMP levels in PBMC in spite of its effects on cell proliferation.

## Conclusions

From the results obtained in this study, it is possible to conclude that PBMC obtained from women during the follicular and luteal stages of the cycle behave similar in terms of *PRL* and cytokines gene expression. Of particular importance was the observation that the phase of the cycle did not influence *PRL* responses to the cAMP agonists or to mitogen activation, thus indicating that hormonal dynamic changes occurring during the menstrual cycle did not significantly modulate *PRL* expression in PBMC. Finally, as IL-2 decreases *PRL* expression in PBMC, and this cytokine is shown to be down regulated in subjects affected with SLE, the results presented herein might help to explain the increases in *PRL* expression and secretion by PBMC under this autoimmune pathological condition.

## Acknowledgements

Leticia González is a Ph.D. student from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and receiver of a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. This publication is required to obtain the Ph.D. degree. The authors wish to thank Dr. Enrique Reyes-Muñoz from the Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Mexico City for his help and clinical support in the selection and recruitment of volunteers, as well as, in blood sampling and serum hormone measurements.

## Funding

This Research did not receive any specific grant from founding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

## Declaration of interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

1. Lu FX, Ma Z, Moser S, et al. Effects of ovarian steroids on immunoglobulin-secreting cell function in healthy women. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(5):944–949.
2. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6–7): A479–485.

3. Tiniakou E, Costenbader KH, Kriegel MA. Sex-specific environmental influences on the development of autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2013;149(2):182–191.
4. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2001;2(9):777–780.
5. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2007;6(6):366–372.
6. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, et al. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol.* 2011;88(2):185–194.
7. Faas M, Bouman A, Moesa H, et al. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril.* 2000;74(5):1008–1013.
8. Giglio T, Imro MA, Filaci G, et al. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci.* 1994;54(18):1305–1312.
9. Djursing H, Hagen C, Moller J, et al. Short- and long-term fluctuations in plasma prolactin concentration in normal subjects. *Acta Endocrinologica.* 1981;97(1):1–6.
10. McNeilly AS, Chard T. Circulating levels of prolactin during the menstrual cycle. *Clin Endocrinol.* 1974;3(2):105–112. doi:10.1111/j.1365-2265.1974.tb01786.x
11. Tanner MJ, Hadlow NC, Wardrop R. Variation of female prolactin levels with menopausal status and phase of menstrual cycle. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011;51(4):321–324. doi:10.1111/ajo.2011.51.issue-4
12. Marano RJ, Minireview: B-JN. Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol.* 2014;28(5):622–633. doi:10.1210/me.2013-1349
13. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(16):7713–7716. doi:10.1073/pnas.89.16.7713
14. Wu H, Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology.* 1996;137(1):349–353. doi:10.1210/endo.137.1.8536634
15. Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci.* 1996;59(8):599–614. doi:10.1016/0024-3205(96)00225-1
16. Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, et al. Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. *Lupus.* 2001;10(8):554–561. doi:10.1191/096120301701549688
17. Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, et al. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(11):3664–3669.
18. Mendez I, Alcocer-Varela J, Parra A, et al. Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin. *Lupus.* 2004;13(1):45–53. doi:10.1191/0961203304lu487oa
19. Tang MW, Garcia S, Gerlag DM, et al. Insight into the endocrine system and the immune system: a review of the inflammatory role of prolactin in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Front Immunol.* 2017;8:720.
20. Costanza M, Prolactin: PR. Friend or foe in central nervous system autoimmune inflammation? *Int J Mol Sci.* 2016;17:12.
21. Jara LJ, Medina G, Saavedra MA, et al. Prolactin has a pathogenic role in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res.* 2017;65(2):512–523.
22. Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18(5):456–461.
23. Saha S, Tieng A, Pepeljugoski KP, et al. Prolactin, systemic lupus erythematosus, and autoreactive B cells: lessons learnt from murine models. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40(1):8–15.
24. Peeva E, Venkatesh J, Michael D, et al. Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(5):310–319.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156–159.
26. Villanueva LA, Mendez I, Ampuero S, et al. The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(10):725–731.
27. Radke L, Lopez Hemmerling DA, Lubitz A, et al. Induced cytokine response of human PMBC-cultures: correlation of gene expression and secretion profiling and the effect of cryopreservation. *Cell Immunol.* 2012;272(2):144–153.
28. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, et al. 17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. *Fertil Steril.* 2004;82(Suppl 3):1212–1219.
29. Rogers A, Eastell R. The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone.* 2001;29(1):30–34.
30. Wands JR, Podolsky DK, Isselbacher KJ. Mechanism of human lymphocyte stimulation by concanavalin A: role of valence and surface binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73(6):2118–2122.
31. Burleson DG, Sage HJ. Effect of lectins on the levels of cAMP and cGMP in guinea pig lymphocytes: early responses of lymph node cells to mitogenic and non-mitogenic lectins. *J Immunol.* 1976;116(3):696–703.

# **Significado biológico de la prolactina linfocitaria en sujetos sanos y afectados con lupus eritematoso generalizado bajo diferentes condiciones fisiológicas**

## **Informe al donador sano durante el ciclo menstrual**

La prolactina es una hormona producida por la glándula hipófisis y tiene importantes funciones en el embarazo, la lactancia y el sistema inmunológico. A este respecto, la prolactina también es producida por las células de defensa desconociéndose todavía el por qué estas células la producen y qué factores favorecen este proceso. Por esta razón, el objetivo más importante de este proyecto es investigar la relación entre los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo menstrual y el embarazo de mujeres normales y afectadas con lupus eritematoso generalizado (LEG) con la capacidad de las células de defensa de producir a la prolactina. Para cumplir con este objetivo, se requiere obtener estas células a partir de muestras de sangre de voluntarias sanas o afectadas con LEG y poder estudiar la producción de la prolactina y su receptor celular en estas células, tanto en el ciclo menstrual como en el embarazo.

Por este motivo la invitamos a donar 20 mililitros de sangre en tres ocasiones durante su ciclo menstrual. Para ello, le solicitamos se presente en ayuno de 8 a 12 horas para la toma de sangre a través de la punción de la vena de su antebrazo. En caso de mareo o nerviosismo, el procedimiento será interrumpido y se le mantendrá en observación en el instituto hasta que se sienta completamente bien. Este procedimiento no pone en riesgo su salud, sin embargo, puede presentar dolor en el momento de la punción y posteriormente un pequeño hematoma. En las muestras de sangre se medirán varias hormonas que son producidas normalmente en la glándula hipófisis como la prolactina, la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante así como hormonas producidas por el ovario como el estradiol, la progesterona. Por otra parte, se obtendrán las células de defensa para estudiar la producción de la prolactina y de su receptor. La información generada será estrictamente confidencial manteniendo en el anonimato sus datos personales. En ningún caso las muestras de sangre y los resultados serán asociados con las voluntarias. Las muestras se utilizarán únicamente para los fines que le fueron explicados, conservadas durante el desarrollo de este estudio y posteriormente descartadas. En caso de aceptar participar en este estudio, usted podrá libremente retirarse en

el momento que así lo desee sin perder ninguno de los beneficios como actual o futuro paciente del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán o del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Si por alguna razón usted requiere de mayor información sobre su participación en el estudio, tendrá completa libertad de preguntar y el investigador contestará cualquier duda o aclaración relacionada con su participación.

**Investigadores responsables:**

En el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

Dr. Enrique Reyes.  
Tel: 5520 9900 Ext. 307

En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Fernando Larrea Gallo.  
Tel: 5573 1160

M. en C. Leticia González Ibarra  
Dr. Saúl Lira Albarran  
Tel: 5487 0900 Ext. 2417 y 2418

## Carta de consentimiento informado

Fecha y Lugar: \_\_\_\_\_

Por medio de la presente acepto donar 20 ml de sangre para su utilización en el proyecto de investigación titulado **“Significado biológico de la prolactina linfocitaria en sujetos sanos y afectados con lupus eritematoso generalizado bajo diferentes condiciones fisiológicas”**.

Se me ha explicado claramente los motivos del estudio, se me han esclarecido las dudas acerca del proyecto y he sido informada que mi participación no causará riesgo ni beneficio alguno. Mi muestra de sangre será utilizada exclusivamente para los fines que me fueron señalados y será desechada al finalizar el estudio. La información que se obtenga de mi participación en este estudio será de carácter estrictamente confidencial y su uso será exclusivamente para fines de investigación y enseñanza.

Entiendo que conservo el derecho de negar la donación de mi sangre si así lo considero conveniente para mis intereses y renunciar como voluntaria en cualquier momento del estudio, sin que ello afecte la atención médica que recibo o llegara a recibir del instituto. El investigador me ha asegurado que los datos relacionados con mi persona serán manejados de manera estrictamente confidencial y en ningún caso las muestras y/o los resultados serán asociados directamente conmigo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del donante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador  
Responsable