



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Expresión de las isoformas del receptor de PRL y su participación en la apoptosis de linfocitos B inmaduros.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
WENDY KAREN GARCÍA MÉNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. A. KARINA CHÁVEZ RUEDA**

**ASESOR DE TESIS:
M EN C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE**



CIUDAD DE MÉXICO.

AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez
VOCAL: Dra. Adriana Karina Chávez Rueda
SECRETARIO: M. en C. Rosa Elba Galván Duarte
1er. SUPLENTE: M. en C. Araceli García de Valle
2º SUPLENTE: Q.F.B Luis Antonio Cervantes Candelas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Con el financiamiento del Fondo de Investigación en Salud (FIS/IMSS/PROT/G15/1442), en colaboración del Departamento de Bioquímica y el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Agradecimientos

Este trabajo es resultado de un esfuerzo en conjunto, por lo que agradezco a todas aquellas que con sus ánimos, consejos, guía y dedicación han ayudado a su realización.

Agradezco a la Doctora Karina, por haberme brindado la oportunidad de la realización de este proyecto y por haberme apoyado en la finalización. Gracias por su confianza, paciencia y tiempo.

Agradezco a mis sinodales por la disponibilidad que mostraron en continuar con este trabajo, sin ello no se hubiera podido culminar.

Agradezco a mis amigos y compañeros de Centro Médico por el apoyo brindado, en especial a Rocío Flores por haber compartido su experiencia, brindado parte su tiempo en capacitación y enseñanza.

Agradezco al Doctor Francisco Blanco por mi estancia en Centro Médico de la cual me llevo buenos recuerdos y anécdotas.

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a mi familia, amigos y compañeros que me brindaron su apoyo y confianza para nunca desanimarme y seguir.

Dedicó especialmente a mis padres: Leticia y Jesús, porque ellos me han guiado con sus palabras y por siempre apoyar mis decisiones; gracias por creer en mí y darme siempre ese aliento de confianza e impulso a seguir adelante sin importar como se viera el panorama.

ÍNDICE	pág.
Índice de figuras	i
Abreviaturas	iii
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Planteamiento del problema	17
Hipótesis	18
Objetivos	19
Material y métodos	20
Diagrama de flujo	26
Resultados	27
Discusión	36
Conclusiones	39
Referencias	40
Anexo	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		pág.
Figura 1	Desarrollo de los linfocitos B	5
Figura 2	Mecanismos de tolerancia de linfocitos B	8
Figura 3	Lupus Eritematoso Sistémico	10
Figura 4	PRL y Receptor de PRL	13
Figura 5	Expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea en ratones de 9 semanas	28
Figura 6	Expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea en ratones con niveles elevados de PRL	29
Figura 7	Caracterización de las células WEHI-231	30
Figura 8	Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231	31
Figura 9	Purificación de las células WEHI-231 que expresan el receptor de PRL	32
Figura 10	Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231	33
Figura 11	Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por Anexina V	34

Figura 12	Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3	35
Figura 13	Tabla de concentraciones séricas de PRL y ab anti-ADNds antes y después de tratamiento con Metoclopramida y PBS.	48
Figura 14	Purificación de las poblaciones de linfocitos B de médula ósea	49
Figura 15	Amplificación de las isoformas del receptor de PRL	50

ABREVIATURAS

HSC	Célula troncal Hematopoyética
ELP	Progenitor linfoide temprano
CLP	Progenitor linfoide común
Ig's	Inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de la inmunoglobulina
IgL	Cadena ligera de la inmunoglobulina
CD	Molécula de diferenciación
Pro-B	Linfocito pro-B
Pre-B	Linfocito pre-B
Pre-BCR	Receptor de linfocito pre-B
IL	Interleucina
BCR	Receptor de linfocito B
IgM	Inmunoglobulina M
T1	Linfocito B transitorio 1
T2	Linfocito B transitorio 2
T3	Linfocito B transitorio 3

MZ	Linfocito B de zona marginal
FO	Linfocito B folicular
LES	Lupus eritematoso sistémico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PRL	Prolactina
IgG	Inmunoglobulina G

Resumen

Los niveles altos de Prolactina (PRL) se relacionan con la aparición de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), la esclerosis múltiple (EM), etc. En ratones MRL y MRL/lpr, que desarrolla una enfermedad similar a LES los niveles altos de PRL exacerbaban la enfermedad y promueve la maduración de los linfocitos B. Los distintos estadios de maduración del linfocito B de médula ósea provenientes de estas cepas de ratones expresan el receptor de PRL y esta expresión aumenta en los linfocitos B inmaduros en estado de hiperprolactinemia; sin embargo, se desconoce el tipo de isoforma que presentan. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de las isoformas del receptor de PRL y la participación de la PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros. La expresión de las isoformas del receptor se determinó por PCR en linfocitos pro-B, pre-B e inmaduros provenientes de ratones (C57BL/6 y MRL) de 9 semanas de edad y con hiperprolactinemia, con lo cual se encontró que los linfocitos B de médula ósea solo expresan la isoforma larga del receptor de PRL y que esta expresión del receptor es diferente entre la cepa control y la que desarrolla LES. En los ensayos de apoptosis se utilizó como modelo las células WEHI-231(inmaduros), las cuales fueron estimuladas con PRL y después entrecruzadas su BCR con un anticuerpo anti-IgM. Los resultados obtenidos mostraron que la PRL disminuyó la apoptosis inducida por entrecruzamiento del BCR. Lo que sugiere que la prolactina podría incrementar la sobrevivencia de las clonas autorreactivas tras disminuir su eliminación por apoptosis en linfocitos B inmaduros.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B son células de la respuesta inmune que tienen como función la producción de anticuerpos. Su proceso de maduración inicia en médula ósea y finaliza en bazo; a lo largo de este proceso de maduración y diferenciación, los linfocitos pasan por diversos puntos de control que tienen como finalidad la eliminación de clonas auto-reactivas. La falla en la eliminación de estas clonas, en conjunto con factores genéticos y ambientales tiene como consecuencia la aparición de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES). En pacientes con LES y en cepas de ratones que desarrollan una enfermedad similar a LES (NZB/W, MRL y MRL/lpr), los niveles séricos altos de Prolactina incrementan la secreción de igG anti-ADN y proteinuria ocasionando que la enfermedad se exacerbe. Se sabe que en ratones de las cepas MRL/lpr, MRL y C57BL/6, las poblaciones de linfocitos B de médula ósea expresan el receptor de PRL y esta expresión es mayor en las cepas que desarrollan la enfermedad en comparación con la cepa control (C57BL/6). Sin embargo, no se conoce qué isoformas del receptor de PRL se expresa en los estadios de maduración de los linfocitos B de médula ósea y si hay diferencia en la expresión de la isoforma entre las distintas cepas de ratón. De igual modo, se sabe que en las cepas que desarrollan LES el aumento de los niveles séricos de PRL induce una disminución en el número absoluto de linfocitos B inmaduros y un incremento en el siguiente estadio de maduración del linfocito B.

Por otro lado, se conoce que en el estadio de linfocito B inmaduro se llevan a cabo los mecanismos de tolerancia central (edición del receptor y delección clonal) para la eliminación de clonas auto-reactivas. Para estudiar uno de estos mecanismos, la delección clonal por apoptosis se emplea la línea celular WEHI-231 que presenta un

fenotipo de linfocitos B inmaduros. Con base a lo anterior y que la isoforma larga y las cortas tienen diferentes vías de señalización, resulta interesante determinar el patrón de expresión de las isoformas del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea; así como determinar la participación de la PRL en la apoptosis en los linfocitos B inmaduros. De acuerdo con los antecedentes se cree que la PRL promoverá la supervivencia de los linfocitos B inmaduros, al disminuir la apoptosis de estas células, para lo cual, se empleará como modelo de estudio la línea celular WEHI-231; las células serán pre-incubadas con PRL, se entrecruzarán el BCR con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ lo cual dará la señal de muerte por apoptosis. La apoptosis será determinada por citometría de flujo usando el marcaje con anexina-V y mediante la detección de caspasa-3 activa. Mientras que se empleará la técnica de PCR tiempo real, para determinar la expresión de las isoformas en las distintas poblaciones de linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros) en ratones de 9 semanas y con hiperprolactinemia de las cepas C57BL/6 y MRL.

MARCO TEÓRICO

Desarrollo de linfocitos B

En médula ósea las células troncales hematopoyéticas (HSC) se diferencian a progenitores linfoides tempranos (ELP), los cuales dan lugar a los progenitores linfoides comunes (CLP), los linfocitos B surgen a partir de estos progenitores que también pueden dar origen a linfocitos T, células dendríticas y células NK.¹⁻² Este proceso de maduración requiere de diferentes señales y factores de transcripción (PU.1, Ikaros, E2A, EBF, FOXO1 Pax5, Bcl-6, Blimp-1, IRF4, IRF8) que en conjunto reclutan proteínas que activan genes del linaje B o reprimen genes asociados a otros linajes.³⁻⁶ Los distintos estadios de maduración del linfocito B en médula ósea, se pueden diferenciar por la expresión de moléculas de superficie (fenotipo) y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y ligera (IgL) (Figura 1). Ambas cadenas están constituidas por regiones variables y constantes; la región variable de IgH está formada por los segmentos génicos VDJ, mientras que la IgL se genera a partir de los segmentos VJ. A este proceso se le conoce como recombinación V (D) J y es mediado por las proteínas RAG1/RAG2 (del inglés *recombinase activating gene 1 and 2*).⁷⁻¹⁰

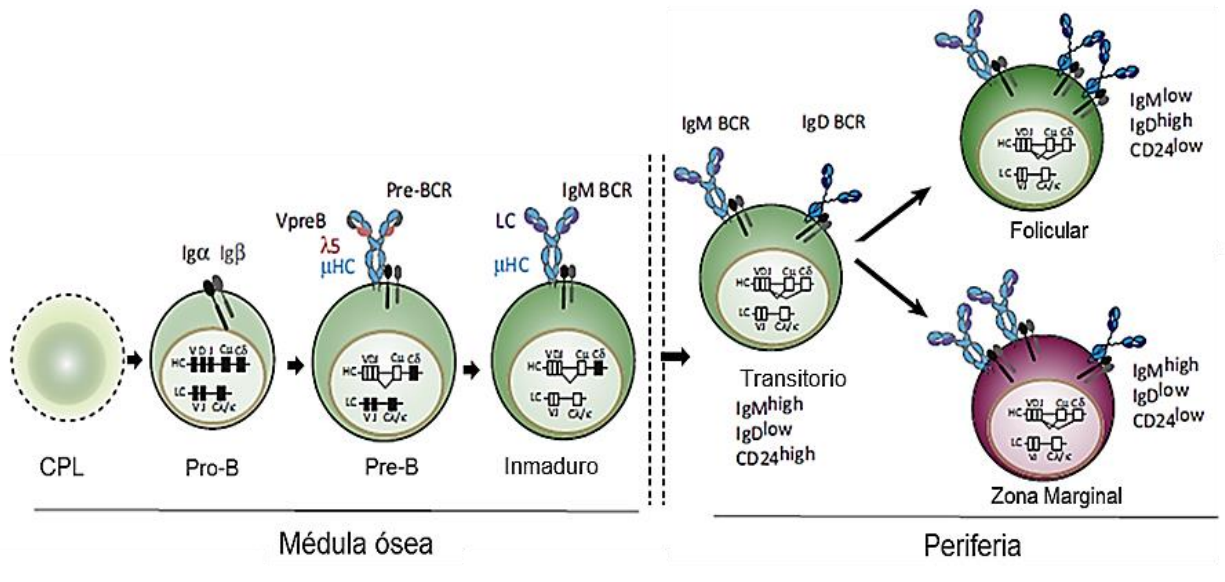


Figura 1. Desarrollo de los linfocitos B. Los linfocitos B en médula ósea pasan por distintos estadios de maduración: pro-B, pre-B e inmaduros. Estos estadios se pueden diferenciar por la expresión de su fenotipo y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y ligera (IgL). Los linfocitos B inmaduros migran a bazo para completar su diferenciación y se denominan linfocitos B transitorios (T). Al terminar su maduración se convierten en linfocitos B maduros de zona marginal (MZ) o foliculares (FO). Modificado de Hobeika E y col. 2016 ¹¹.

Los linfocitos pro-B representan el estadio más temprano del linaje B, se caracterizan por presentar un fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁻CD43⁺CD25⁻CD23⁻ y por la recombinación del fragmento variable de IgH. La primera recombinación se da entre los fragmentos D_H y J_H (D_HJ_H), seguida de la recombinación del fragmento V_H con D_HJ_H, posteriormente se une la parte constante (μ) por un mecanismo de “splicing” alternativo. Cuando IgH se expresa exitosamente, se asocia con las proteínas de señalización Igα (CD79a) e Igβ (CD79b) y la cadena ligera subrogada formada por λ5 y Vpre-B, generando el receptor de antígeno del linfocito pre-B (pre-BCR) que marca la última fase del linfocito pro-B. Durante este estadio ocurre la exclusión alélica del locus de IgH, lo cual tiene como finalidad asegurar que sólo una cadena IgH sea expresada.⁷⁻⁹ La expresión del pre-BCR en superficie indica

que la recombinación de genes de la cadena IgH se realizó correctamente y regula el proceso de selección positiva de linfocito pro-B a pre-B.

Los linfocitos pre-B tienen un fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁻CD43⁻CD25⁺CD23⁻. En este estadio la señalización del pre-BCR junto con la del receptor de IL-7 inducen la proliferación de los linfocitos pre-B “grandes” que sirve para aumentar el número de células que tienen éxito en la recombinación de la cadena IgH. Los cuales se diferencian hacia linfocitos pre-B “pequeños” en donde se lleva la recombinación de los segmentos génicos de la cadena IgL, paso importante para continuar con la diferenciación del linfocito B.¹²⁻¹⁴ La IgL se une a IgH (cadena μ) más la subunidad de señalización (Ig α /Ig β) para formar el BCR (isotipo IgM) que se expresa en la superficie celular, lo que da lugar a la selección positiva del linfocito pre-B al estadio inmaduro (B220⁺CD93⁺IgM⁺CD43⁻CD25⁻CD23⁻), último punto de control en la linfopoyesis de B en médula ósea.^{7-9,11}

Los linfocitos B inmaduros migran a bazo para completar su diferenciación y se denominan linfocitos B transitorios (T), estos se diferencian de los maduros por tener una vida media corta y expresar el marcador AA4⁺(CD93). Los linfocitos B transitorios marcan el vínculo crucial entre los linfocitos B inmaduros de médula ósea y los linfocitos de la periferia, se dividen por su fenotipo de superficie en tres distintas poblaciones: T1 (B220⁺CD93⁺IgM^{hi}CD23⁻), los T2 (B220⁺CD93⁺IgM^{hi}CD23⁺) y los T3 (B220⁺CD93⁺IgM^{low}CD23⁺)^{12,13}. Las células T1 B presentan un fenotipo más parecido al de las células B inmaduras de la médula ósea y se distinguen de los otros subconjuntos por que sufren apoptosis inducida por BCR, mientras que las células T2 B proliferan y son rescatadas de la apoptosis. Las células T3 son una población no proliferante, que se asemeja T2 con la excepción de un nivel más bajo de IgM de superficie¹³. La sobrevivida

de estos linfocitos depende del factor activador de linfocitos B (BAFF) a través de la unión a alguno de sus tres receptores (BAFF-R, BCMA y TACI); al terminar su maduración se convierten en linfocitos B maduros de zona marginal (MZ) o foliculares (FO)¹²⁻¹⁴ (Figura 1). A lo largo del proceso de maduración y diferenciación del linfocito B existen diversos puntos de control que tienen como finalidad la eliminación de clones auto-reactivos para el mantenimiento de la tolerancia, la cual se divide en central y periférica.¹⁵⁻¹⁷

Mecanismos de tolerancia

Durante el desarrollo de los linfocitos B en médula ósea se produce una amplia diversidad de receptores de linfocitos B (BCRs), como resultado de la recombinación aleatoria de los genes VDJ de las inmunoglobulinas (Ig's).^{12,16,18} Esta diversidad permite el reconocimiento de una amplia gama de antígenos extraños por parte del sistema inmune. Sin embargo, la formación de tal variedad implica la generación de clones auto-reactivos capaces de reconocer antígenos propios con alta afinidad^{15,16}. Se estima que aproximadamente el 75% de los linfocitos B generados durante las primeras etapas de su desarrollo en médula ósea poseen un alto nivel de auto-reactividad.^{16,18} Para evitar la salida de estos linfocitos auto-reactivos a la periferia, existen mecanismos de control que se llevan a cabo dentro de la médula ósea, a lo cual se le denomina tolerancia central.^{16,19} Los mecanismos que inducen tolerancia central son: la edición del receptor y la delección clonal. La edición del receptor es el principal mecanismo de la tolerancia central y consiste en la formación de un nuevo un BCR no auto-reactivo a través del reordenamiento de los genes de cadena ligera. Este mecanismo permite al linfocito B continuar con su desarrollo. Sin embargo, cuando falla este mecanismo se lleva a cabo

la delección clonal, la cual consiste en la eliminación de los linfocitos B auto-reactivos por apoptosis.¹⁹⁻²¹

La mayor parte de los linfocitos B auto-reactivos son eliminados por los mecanismos de la tolerancia central, algunas clonas auto-reactivas logran salir de médula ósea a la periferia.²⁰ Los linfocitos B auto-reactivos en la periferia son eliminados por la tolerancia periférica, la cual esta mediada por los mecanismos de delección clonal y anergia ²¹.

(Figura 2).

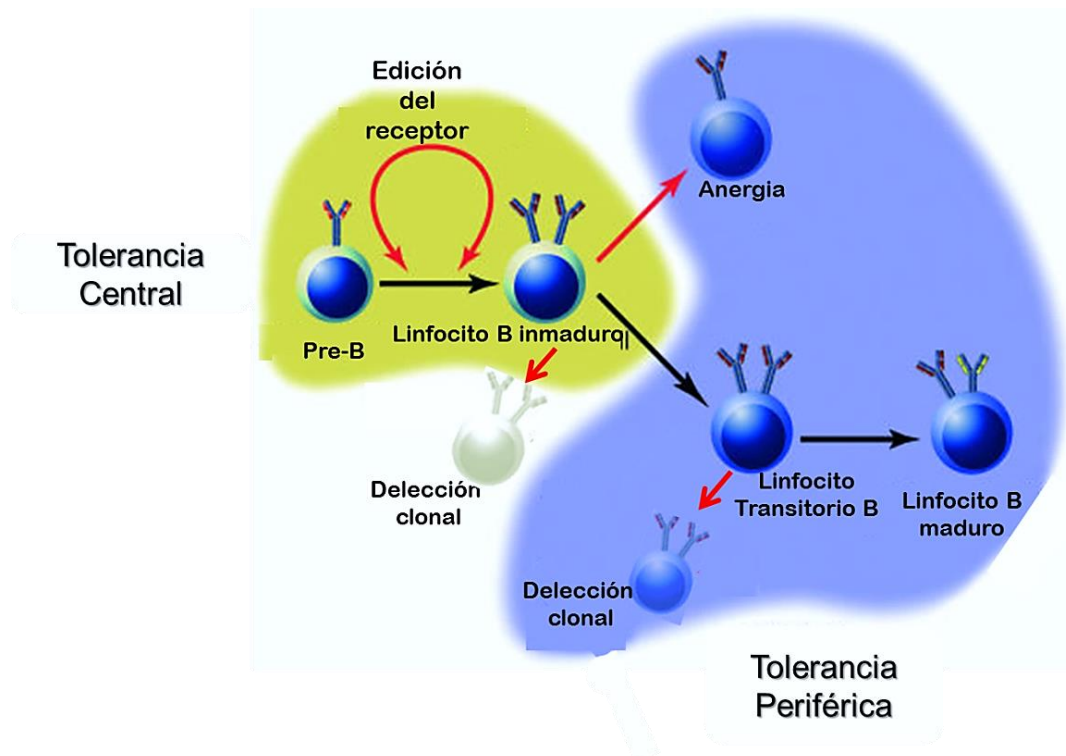


Figura 2. Mecanismos de tolerancia de linfocitos B. La tolerancia central se da en médula ósea y es mediada por delección clonal, edición del receptor. Mientras que la tolerancia periférica es mediada por delección clonal y anergia. Modificado de Wang L y col, 2003 ²².

Las señales emitidas por el BCR son esenciales para la maduración y activación de los linfocitos B.^{11,22-23} La intensidad de la señal depende del grado de entrecruzamiento del BCR, que a su vez depende de la concentración del antígeno y la afinidad del BCR.¹¹ La

señalización del BCR induce en los linfocitos B maduros activación, proliferación y diferenciación; mientras que en los linfocitos B inmaduros induce muerte celular por apoptosis.²²⁻²³ La delección clonal o muerte celular por apoptosis es un mecanismo tanto de tolerancia central como de tolerancia periférica²¹⁻²². Para entender el proceso de delección clonal en linfocitos B se emplea como modelo *in vitro* las líneas celulares de linfoma B CH31 y WEHI-231.²⁴ La línea celular WEHI-231 proviene de células B de linfoma de ratones (BALB/c x NZB) F1 y es clasificada como una línea de linfocitos B inmaduro debido a que presenta un fenotipo similar al de los linfocitos B inmaduros (IgM⁺, IgD^{-/low}, FcR^{low}, Fas^{low}, MHC clase II).²⁵⁻²⁷ Al entrecruzar el BCR de las células WEHI-231 con un anticuerpo anti-IgM F(ab)₂ se genera una respuesta análoga a la delección clonal estimulada por el antígeno, esto produce que las células se detengan en la fase G1 del ciclo celular y posteriormente mueran por apoptosis.²⁷⁻²⁹ Durante este proceso se conoce que intervienen diversas moléculas como: c-myc, p53, bax, bcl- 2, bcl-x,y y antígeno Fas para su regulación²⁹. Además, se sabe que la inhibición del ciclo celular puede prevenirse por mitógenos derivados de bacteria tales como lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano y por derivados de linfocitos T. La sobreexpresión de c-myc y de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células WEHI-231 se correlaciona con la resistencia a la apoptosis inducida por anti-IgM F(ab)₂.²⁹

La falla en los mecanismos de tolerancia del linfocito B en conjunto con factores genéticos y ambientales tiene como consecuencia la aparición de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), en donde existe una falla en la tolerancia central y periférica, esto sucede en pacientes y los modelos de ratón.^{19,30-32}

Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

LES es una enfermedad crónica autoinmune de etiología desconocida que puede afectar prácticamente cualquier órgano o sistema del organismo.^{30,33} Los pacientes con LES presentan defectos en los mecanismos de tolerancia central y periférica, lo que origina clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B.^{17,19} Estos linfocitos presentan anomalías en su activación, producción de citocinas y diferenciación a células de memoria. Además, existe una hiperactividad por parte de los linfocitos B que se identifica por la presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra diversas moléculas del núcleo como el ADN, ARN, Ro, La, histonas, etc., los cuales pueden formar complejos inmunes que con frecuencia salen de circulación y se depositan en el riñón, piel, cerebro entre otros tejidos causando inflamación y daño tisular³³⁻³⁴ como se observa en la Figura 3

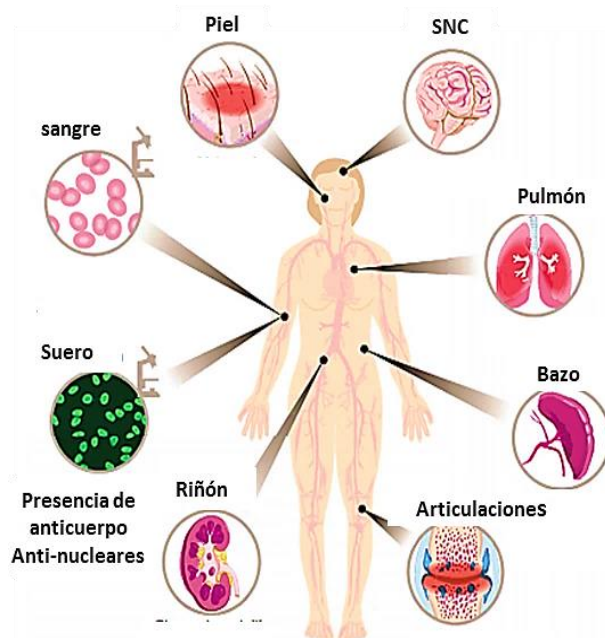


Figura 3. Órganos afectados durante el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) por el depósito de complejos inmunes. LES es una enfermedad autoinmune y crónica, que se caracteriza por la producción de auto-anticuerpos, los cuales pueden formar complejos inmunes que se depositan en el riñón, piel, cerebro entre otros tejidos causando inflamación y daño tisular. Modificado de Crampton S y col, 2014³⁴.

Para entender mejor la fisiopatogenia de LES se emplean como modelo de estudio las cepas de ratones NZBxNZW F₁, BXSB, MRL y MRL-FAS^{lpr} (MRL/lpr) las cuales desarrollan espontáneamente una enfermedad semejante a lupus en humanos.³⁴⁻³⁵ La cepa MRL/lpr, tiene una mutación en la molécula FAS que es mediadora en la apoptosis y se caracteriza por presentar glomerulonefritis, depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergammaglobulinemia y producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente dirigidos contra ADN de doble cadena (ADNds).³⁶ Mientras que la cepa MRL no presenta la mutación y la enfermedad es menos agresiva y aparece más tardíamente.³⁵ Estas cepas se emplean para evaluar la relevancia que tienen los linfocitos B en el desarrollo de lupus.

Se desconoce la etiología de LES; sin embargo, se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, ambientales, hormonales y la respuesta inmune tienen una estrecha interacción para que se desarrolle autoinmunidad y se exprese clínicamente la enfermedad.^{30,37} LES tiene una incidencia mundial de 5.2 individuos por cada 100000 personas al año, afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer: hombre de 9:1) en edad reproductiva, este predominio al sexo femenino se atribuye a las propiedades inmuno-estimuladoras de las hormonas, como la PRL.³⁸⁻³⁹ LES tiene una tendencia a presentarse o bien a exacerbarse durante el embarazo, en el cual los niveles séricos de PRL se encuentran elevados.⁴⁰⁻⁴¹

Prolactina y receptor de PRL

La PRL es una proteína globular compuesta de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intracadena, la cual forma una estructura tridimensional de 4 α -hélices antiparalelas.⁴² Esta hormona se sintetiza por las células de la hipófisis anterior y de manera extra-hipofisiaria por el endometrio, la médula ósea, el bazo, las células epiteliales mamarias, los linfocitos T y B entre otros.^{41,44} Su liberación se estimula por serotonina, hormona liberadora de tirotrópina, péptido intestinal vasoactivo y por diferentes fármacos como la domperidona y metoclopramida, mientras que se inhibe por dopamina y por sus agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina. Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales se pueden clasificar en cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) crecimiento y desarrollo, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunoregulación, cada una de estas funciones dependerá del tipo celular en donde se exprese su receptor⁴²⁻⁴⁵. Los efectos biológicos de la PRL son mediados por la interacción con su receptor, el cual pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I^{42,45}. El receptor de PRL consta de tres dominios: extracelular que permite la unión al ligando, transmembranal e intracelular que permite la señalización. Se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B. En el ratón se conocen 4 isoformas (una larga y tres cortas) idénticas en el dominio extracelular pero diferentes en tamaño y composición del dominio intracelular⁴⁵⁻⁴⁷ como se muestra en la (Figura 4)

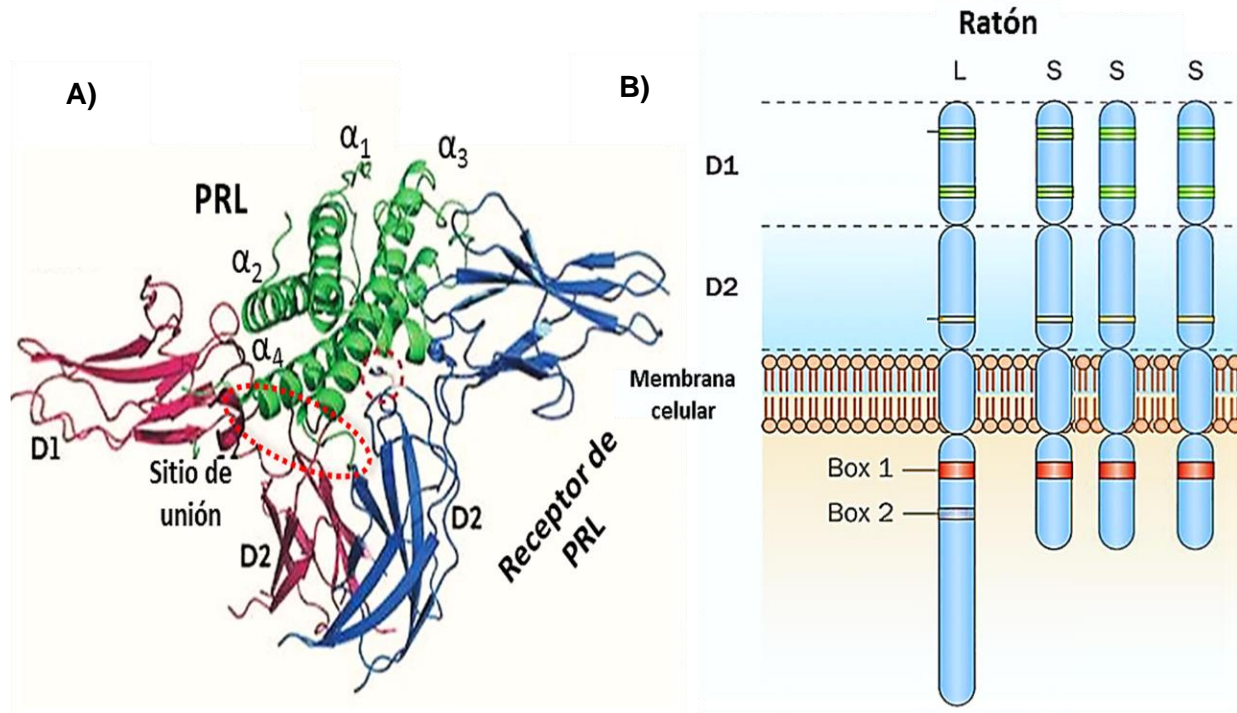


Figura 4. PRL y Receptor de PRL. A) Estructura tridimensional de la PRL. La PRL consta de 4 α -hélice antiparalelas B) isoformas del receptor de PRL de ratón. Se han descrito 4 isoformas, una isoforma larga y tres cortas. Las isoformas son idénticas en la región extracelular pero diferente en tamaño y composición de la región intracelular. Modificado de Newey P y col, 2012⁴⁴ y Bernard V y col, 2015⁴⁵.

Prolactina y sistema inmune

La relación entre PRL y el sistema inmune se hizo evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia.⁴⁸ Posteriormente en 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina (agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de PRL).⁴⁹ Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL Hipofisiaria a través de citocinas como: Interlucina-1 (IL-1), Interlucina-6 (IL-6) y TNF- α . Las citocinas (IL-6) y (IL-1) estimulan la liberación de Prolactina; mientras que la citocina TNF- α la inhibe a través del aumento de dopamina (hormona inhibidora de Prolactina)⁵⁰. Los timocitos y células

mononucleadas son capaces de sintetizar PRL.⁵¹⁻⁵² La estimulación *in vitro* con PRL regula el proceso de maduración (ontogenia) de timocitos dobles negativos (CD4⁻CD8⁻) a dobles positivos (CD4⁺CD8⁺) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2.⁵³ En linfocitos pro-B (B220⁺CD43⁺) de ratones transfectados con el receptor, la PRL aumenta la diferenciación hacia linfocitos pre-B (B220⁺CD43⁻).⁵⁴ En ratones con trasplante de médula ósea la administración de PRL recombinante induce un incremento en la linfopoyesis.⁵⁵ En ratones “*knock out*” para PRL y su receptor no se encuentran defectos en la producción de los linfocitos a pesar de que el número absoluto de los linfocitos B y sus precursores estén ligeramente disminuidos.⁵⁶⁻⁵⁷ Estos resultados muestran que la PRL participa en el proceso de linfopoyesis. Aunque, su ausencia no es crítica y su participación en este proceso puede ser sustituida por otros factores como interleucinas como IL-2 e IL-7.

Prolactina y LES

Existen estudios que relacionan los niveles altos de PRL con la aparición de enfermedades autoinmunes. En pacientes con LES se describen concentraciones séricas altas de PRL que se correlacionan con mayor actividad de la enfermedad.⁵⁹

En ratones que desarrollan lupus, el estado de hipoprolactinemia exacerba la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana al presentar un incremento de proteinuria y secreción anticuerpos IgG, principalmente dirigidos contra ADN. En contraste, la inhibición de la secreción de PRL con bromocriptina incrementa la supervivencia en estos ratones.⁶⁰⁻⁶¹ Así mismo, estudios realizados en ratones de las cepas MRL y

MRL/lpr indican que al inducirles un estado de hiperprolactinemia con metoclopramida la enfermedad se exacerba.⁶²

Actualmente se sabe que las distintas poblaciones de linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e Inmaduras) expresan el receptor de PRL en ratones MRL/lpr, MRL y C57BL/6, encontrando una mayor expresión entre las cepas que desarrollan LES (MRL/lpr, MRL) en comparación con la cepa control (C57BL/6).⁶³ La determinación del receptor de PRL se realizó a nivel de ARNm por PCR tiempo real y proteína por citometría de flujo, detectando la región extracelular del receptor que es igual en todas las isoformas. Sin embargo, se desconoce la isoforma que se expresa en las poblaciones de linfocitos B de médula ósea de las distintas cepas de ratón. Sabiendo que la isoforma larga y las cortas tienen diferentes vías de señalización, resulta interesante determinar el patrón de expresión de las isoformas del receptor de PRL en los ratones que desarrollan LES. De igual manera, se conoce que solamente en las cepas que desarrollan lupus, el incremento de los niveles de PRL induce una disminución en el número absoluto de linfocitos B inmaduros y un incremento en los Transitorios-1.⁶²⁻⁶³ Además, que en presencia de PRL la sobrevivencia de los linfocitos B inmaduros aumenta.⁶³ Lo que sugiere que el incremento de PRL pudiera favorecer la maduración/salida de clones auto-reactivos de médula ósea al afectar algún mecanismo de tolerancia de los linfocitos B. Sabiendo que en el estadio de linfocito B inmaduro se llevan a cabo los mecanismos de tolerancia para la eliminación de clones auto-reactivos, decidimos estudiar la participación de la PRL en el mecanismo de delección clonal (apoptosis) empleando como modelo la línea celular WEHI-231. La línea celular WEHI-231 se emplea como modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos que regulan la apoptosis inducida por antígeno

en los linfocitos B inmaduros, debido a que posee muchas de las características de los linfocitos B inmaduros al expresar un fenotipo similar en su membrana celular y al presentar todas las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis, después de entrecruzar su BCR con anti-IgM F(ab)₂.^{25,27,29}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la ontogenia del linfocito B, estas células pasan por diferentes puntos de control que tienen como finalidad eliminar clonas auto-reactivas. La falla en la eliminación de clonas auto-reactivas en conjunto con factores genéticos y ambientales tiene como consecuencia la aparición de enfermedades autoinmunes como LES. En pacientes con LES se conoce que los niveles elevados de PRL en suero están asociados con una mayor actividad de la enfermedad, además en modelos de ratón que desarrollan LES los niveles elevados de PRL exacerban las manifestaciones de la enfermedad. Actualmente se sabe que todas las poblaciones de linfocitos B de médula ósea expresan el receptor de PRL, encontrando una mayor expresión en las cepas que desarrollan LES. Sin embargo, se desconoce la isoforma que se expresa en las distintas poblaciones de linfocitos B de médula ósea entre las distintas cepas de ratón, esto es importante porque la isoforma larga y las cortas tiene diferente vía de señalización. Así mismo, se conoce que en las cepas que desarrollan lupus (MRL y MRL/lpr) el incremento de los niveles de PRL induce una disminución en el número absoluto de linfocitos B inmaduros y un incremento en los Transitorios-1. Lo que sugiere que el incremento de PRL pudiera favorecer la maduración/salida de clonas auto-reactivas de médula ósea al afectar algún mecanismo de tolerancia de los linfocitos B. Sabiendo que en el estadio de linfocito B inmaduro se llevan a cabo los mecanismos de tolerancia central (edición del receptor, delección clonal) para la eliminación de clonas auto-reactivas, además de que expresan el receptor de prolactina. Nos surgieron las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la isoforma del receptor de PRL que se expresa en las diferentes etapas de maduración de linfocitos B de médula ósea en ratones que desarrollan LES?
2. ¿Cuál es la participación de la PRL en la apoptosis del linfocito B inmaduro?

HIPOTESIS

En los linfocitos B de médula ósea se encontrarán expresadas las dos isoformas del receptor de PRL.

La PRL promoverá la sobrevida de los linfocitos B inmaduros, disminuyendo la apoptosis de estas células.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de las isoformas del receptor de PRL y la participación de la PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la isoforma del receptor de PRL que se expresa en las poblaciones de linfocitos B en médula ósea de ratones con y sin hiperprolactinemia.
2. Determinar la isoforma del receptor de PRL que se expresa en las células WEHI-231 (linfocitos inmaduros).
3. Determinar la participación de la PRL en la apoptosis en las células WEHI-231 (linfocitos inmaduros).

MATERIAL Y METODOS

Diseño del proyecto

Experimental, Longitudinal

Universo

Línea celular WEHI-231, linfocitos pro-B, pre-B e inmaduros previamente obtenidos y purificados de un proyecto anterior (Anexo), provenientes de ratones de 9 semanas y con hiperprolactinemia (15 semanas de edad). Cada grupo estuvo conformado por ocho ratones.

Línea celular

Se utilizó la línea celular WEHI-231 proveniente de linfoma de células B de ratones (BALB/c x NZB) F1, la cual se mantuvo en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y en incubación a 37°C y a 5% de CO₂.

Linfocitos B

Se utilizaron las poblaciones de linfocitos B de médula ósea con purezas mayores del 95%, provenientes de los ratones hembra de 9 semanas de edad (antes del tratamiento) y de 15 semanas de edad (después del tratamiento con metoclopramida y PBS) de las cepas C57BL/6 de Harlan y MRL de *Jackson Laboratory* previamente obtenidos en el laboratorio (Anexo).

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti: CD43 (clona eBioR2/60), CD23 (clona B3B4), CD93 (clona AA4.1), CD19 (clona eBio/D3) e IgM de la marca eBiosciences (San Diego, CA,

USA), anti-receptor de PRL (clona E20), anti-IgG biotinilado de la marca Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA, USA), streptavidina-PECy7 y anti-IgM F(ab')₂ de Jackson ImmunoResearch (West, PA, USA).

Extracción de ARN

A partir de la línea celular WEHI-231 y de las poblaciones de linfocitos B de médula ósea se realizó la extracción de ARNm. Las muestras fueron colocadas en Trizol (Invitrogen, USA) (1mL/10⁶ de células), se incubaron durante 5 minutos en hielo y se les adicionó 5µL de glicógeno. Posteriormente fueron tratadas con cloroformo grado biología molecular (Sigma Aldrich, USA) (200µL/1mL de Trizol) y se centrifugó a 12000 rpm/15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Después se adicionó isopropanol (J.T Baker, USA) (550µL/1mL de Trizol) y se incubó toda una noche a -70°C para precipitar el ARN. Se centrifugó a 12000 rpm/15 minutos a 4°C y el botón obtenido se lavó con etanol al 70%. Finalmente se centrifugó 6000 rpm/15 minutos a 4°C para obtener el ARNm y se disolvió en agua inyectable (12µL/1mL de Trizol). De la solución se tomó 2µL y se diluyó en 98µL de agua (dilución 1:50) para cuantificar el ARNm. La concentración y pureza se determinaron a 260 y 280nm de absorbancia empleando el espectrofotómetro GeneQuant Pro.

Síntesis de cADN

A partir de 0.5µg de ARN total extraído se realizó la síntesis de cADN; la primera reacción se realizó en presencia del ARNm, H₂O y 1µL de oligo dT (Invitrogen, USA) a 65°C por 5 minutos; la segunda reacción se llevó a cabo en presencia de la mezcla de reacción

5µL del regulador 5X, 2µL de DDT(Invitrogen, USA), 1µL dNTPs (invitrogen, USA) a 10mM y 1µL de la enzima Superscript III (invitrogen, USA) a 50°C por 1 hora y 15 minutos a 70°C, en el termociclador de Applied Biosystems (San Francisco, CA, USA). El cADN obtenido se almacenó a -20°C.

PCR tiempo real

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR tiempo real usando una mezcla sonda/iniciadores. Para la PCR en tiempo real, se utilizó las sondas de hidrolisis de Roche Diagnostic e iniciadores específicos para el receptor de PRL, isoforma larga del receptor de PRL; receptor de PRL isoforma corta y un iniciador común para ambas isoformas (Cuadro 1). Como gen consecutivo o de referencia se empleó la β -actina. Para cada reacción, se colocó 2.5µl de cADN de la muestra, 1 µl de la mezcla sonda/iniciadores, 2 µl de Master Mix y 4.5 µl de agua inyectable. Se utilizó el termociclador LightCycler II (Roche Diagnostic, Alemania) y las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, y 1 segundo a 72°C y 1 ciclo de enfriamiento a 30 segundos a 40°C. La expresión relativa de los distintos genes se calculó usando la fórmula $2^{\Delta\Delta CT}$. Como control de la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL, se utilizaron células de cáncer de mama de ratón EpH4 (Anexo).

Cuadro 1
Secuencia de primers utilizados

Iniciador		Secuencia
Receptor de PRL	Sentido	5'-GAGGAGGCTCTGGTTCAACA-3'
	Anti-sentido	5'-CAGTAAATGCCACGAACGAA-3'
Receptor de PRL isoforma larga	Anti- Sentido	5'-AAGCCAGACCATGGATACTGGAG-3'
	Común	5'-AGCAGTTCTTCAGACTTGCCCTT-3'
Receptor de PRL isoforma corta	Sentido	5'-TATTTGCTTGCAGAGCCAGT -3'
	Anti-sentido	5'-AAGCCAGACCATGGATACTGGAG-3'
β-actina	Sentido	5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'
	Anti-sentido	5'-AAGGCCAACCCTGAAAAGAT-3'

Purificación de células WEHI-231 receptor de PRL positivas

Las células WEHI-231 fueron incubadas en FACS buffer (PBS con BSA 0.5%) con anticuerpos acoplados a fluorocromos específicos para CD19 e IgM y para el receptor de PRL se usó un anticuerpo anti-receptor de PRL, un segundo anticuerpo biotinilado y streptavidina-PECy5 por 20 minutos a 4°C en oscuridad y con un marcador de viabilidad (Ghost-Red). Se realizó la selección de las células CD19⁺, IgM⁺, Ghost-Red⁻ receptor de PRL⁺. La purificación y adquisición de las células se realizó usando el citómetro FACSaria II de tres láser (BD Biociencias). La calibración del equipo se realizó mediante el uso de perlas fluorescentes (BD Biosciences) y como blanco se utilizó las células sin tinción. Como controles de compensación se utilizó un solo color para cada reactivo utilizado. El análisis de los archivos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Sobrevida y Apoptosis

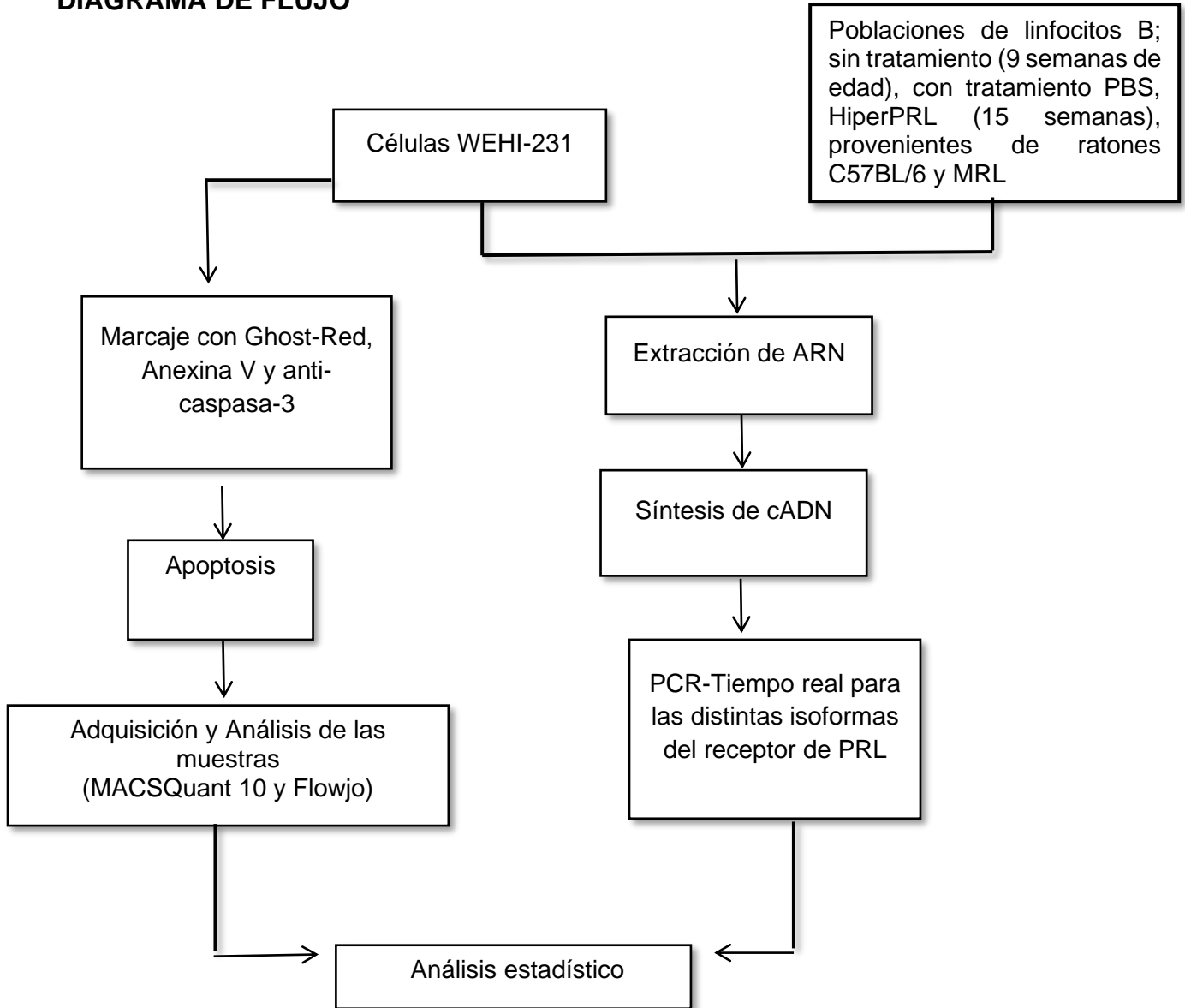
Las células WEHI-231 se pre-incubaron 1 hora con PRL (50ng/mL), se estimularon con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ (10µg/ml) durante 48 horas. Como controles se usaron células incubadas con: a) medio b) PRL y c) anti-IgM. Se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad con Ghost-Red (Tonbobiosciences, San Diego, CA, USA) marcador de viabilidad. La determinación de apoptosis se realizó mediante dos métodos: unión a Anexina V y caspasa-3 activa. Mediante el marcaje con Anexina V-FITC se determinó la apoptosis temprana y tardía de las células. Para lo cual las células se lavaron con PBS Buffer Anexina 1x y se resuspendieron en un volumen total de 200 µL. Posteriormente se incubaron con 2µL de Anexina V-FITC en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la determinación de caspasa-3 las células se permeabilizaron con Citofix/Citoperm (BD Biosciences) durante 1 hora a 4°C; se lavaron con Permawash (BD Biosciences) y marcaron con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa acoplado a FITC (1 hora a 4°C en oscuridad). Las muestras se adquirieron en el citómetro MACSQuant 10 y analizaron en el software Flowjo. Los resultados se evaluaron con base en el porcentaje de células positivas para anexina V y caspasa-3; la intensidad media de fluorescencia (IMF).

Análisis estadístico

Los resultados se describieron de acuerdo con la distribución de los datos (promedio y desviación estándar). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas (células WEHI pre-incubadas con PRL y linfocitos provenientes de ratones de 9 semanas y con

hiperprolactinemia (15 semanas de edad.) se compararon mediante la prueba de t de Student. La diferencia entre grupo se determinó utilizando la prueba ANOVA y la prueba Post hoc Tukey. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de cómputo SPSS 15.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea

A partir de linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros) provenientes de ratones de 9 semanas previamente obtenidos y purificados en el laboratorio (Anexo), de las cepas C57BL/6 y MRL, se determinó la expresión de las isoformas del receptor de PRL mediante PCR tiempo real. Los resultados obtenidos mostraron que los diferentes estadios de maduración del linfocito B en médula ósea expresan solamente la isoforma larga del receptor de PRL. En los ratones C57BL/6 se observó que la expresión relativa del receptor de PRL es mayor en los linfocitos pro-B (0.069 ± 0.038) seguidos de los linfocitos pre-B (0.44 ± 0.009) y los linfocitos B inmaduros (0.010 ± 0.004) son los que expresan menor expresión relativa del receptor. Mientras que en los ratones MRL la expresión relativa del receptor de PRL fue similar en todos los estadios de maduración [pro-B (0.064 ± 0.027), pre-B (0.046 ± 0.042) e inmaduros (0.054 ± 0.028)]; sin presentar diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

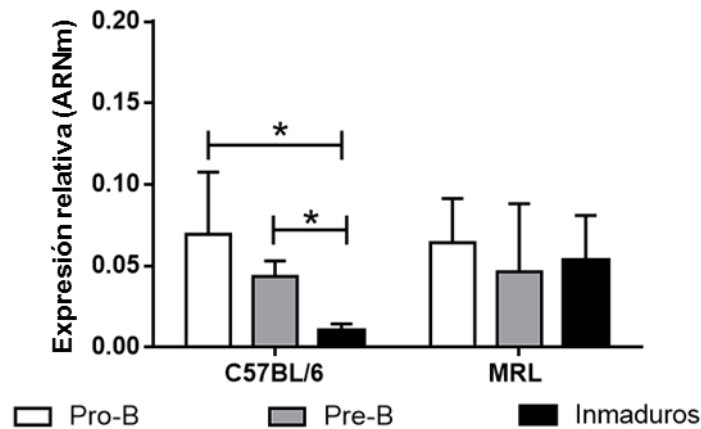


Figura 5. Expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea de ratones de 9 semanas. Mediante PCR tiempo real se determinó la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en los diferentes estadios de maduración del linfocito B de médula ósea en ratones C57BL/6 y MRL. (* $p < 0.05$).

También se determinó la expresión de las isoformas del receptor de PRL en los linfocitos B de médula ósea de ratones C57BL/6 y MRL a los cuales se le indujo un estado de hiperprolactinemia y su control ratones tratados con PBS (Anexo). Los resultados obtenidos mostraron que en ratones tratados con PBS y ratones con niveles elevados de PRL, los diferentes estadios de maduración del linfocito B únicamente expresan la isoforma larga del receptor de PRL. En ratones control C57BL/6 al ser tratados con PBS no se observó diferencia en la expresión relativa del receptor entre los distintos estadios de maduración [pro-B (0.050 ± 0.006), pre-B (0.040 ± 0.001) e inmaduros (0.035 ± 0.004)]; mientras que con niveles elevados de PRL se observó un comportamiento similar a lo obtenido a las 9 semanas, mayor expresión en pro-B (0.038 ± 0.028) seguido de pre-B (0.022 ± 0.014) y con menor expresión los linfocitos B inmaduros (0.011 ± 0.001) como se observa en la figura 6A. Por otro lado, en la cepa que desarrolla la enfermedad MRL, en ratones tratados con PBS se observó una expresión relativa similar entre los linfocitos

pro- B (0.017 ± 0.004) y pre-B (0.023 ± 0.004) y una disminución en los inmaduros (0.013 ± 0.001). Mientras que en ratones con niveles elevados de PRL se observó un patrón de expresión diferente en donde los linfocitos pro-B expresan más receptor (0.038 ± 0.008), y los linfocitos pre-B (0.029 ± 0.006) y los linfocitos B inmaduros (0.023 ± 0.005), los cuales no presentan diferencia en su expresión relativa, como se muestra en la figura 6B.

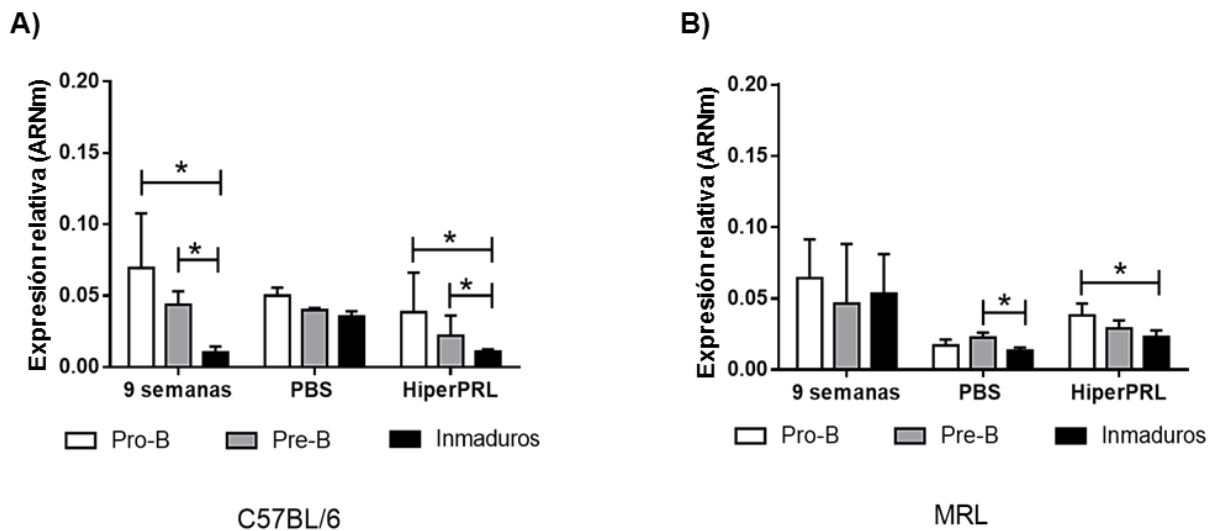


Figura 6. Expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea provenientes de ratones con niveles elevados de PRL. Se determinó mediante PCR tiempo real la expresión de las isoformas del receptor de PRL. Se muestra la expresión relativa de la isoforma larga del receptor de PRL en los linfocitos pro-B, pre-B e inmaduros de ratones de 9 semanas (control), PBS(Vehículo) e HiperPRL. A) C57BL/6 y B) MRL. (* $p < 0.05$).

Caracterización de las células WEHI-231

Para determinar la participación de la PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros se empleó la línea celular WEHI-231. Se determinó el fenotipo de las células WEHI-231

mediante citometría de flujo, comprobando que estas células presentan un fenotipo de linfocito B inmaduro como se muestra en la Figura 7.

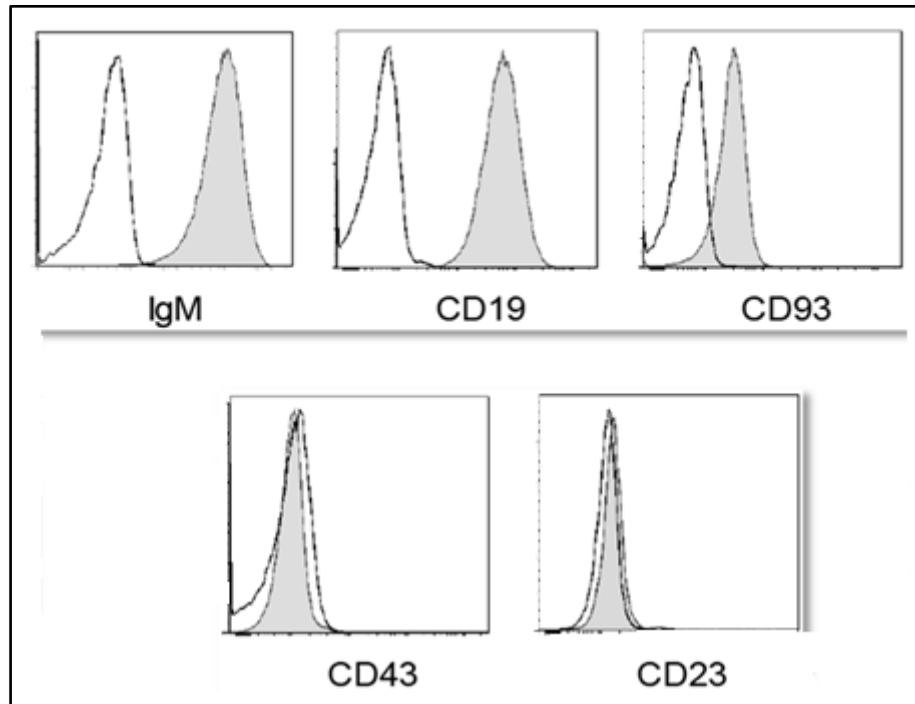


Figura 7. Caracterización de las células WEHI-231. Se determinó el fenotipo de las células WEHI-231 mediante citometría. En el histograma se muestra el marcaje de las células con anticuerpos anti: CD43, CD23, CD93, CD19, IgM; el pico de color blanco representa el control isotipo indicado en la parte inferior de cada diagrama, mientras que el pico color gris muestra las células WEHI-231.

Expresión del receptor de PRL en las células WEHI-231

Se determinó la expresión del receptor de PRL a nivel de ARNm usando iniciadores para detectar la porción extracelular, común en todas las isoformas; encontrando que las células WEHI-231 expresan el receptor (0.51 ± 0.05). También se determinó el tipo de isoforma que expresan usando un iniciador común y un iniciador específico para cada isoforma (larga y corta), encontrando que las células WEHI-231 solo expresan la isoforma larga del receptor de PRL (0.51 ± 0.04) (Figura 8A). Mientras que la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína se determinó mediante el marcaje con un

anticuerpo que reconoce la porción extracelular del receptor, encontrando que $47.50 \pm 5.36\%$ de las células WEHI-231 expresan el receptor de PRL (Figura 8B).

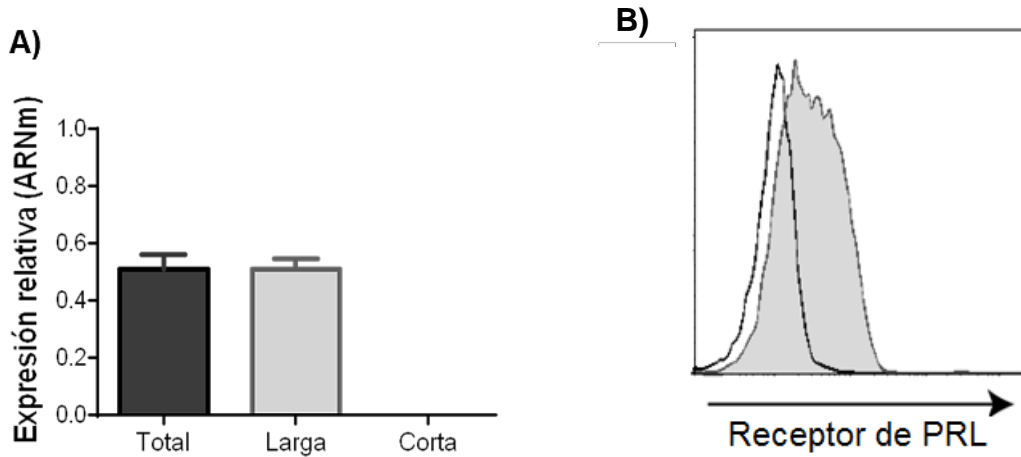


Figura 8. Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231. Se determinó la expresión del receptor de PRL y sus isoformas en células WEHI-231. A) Expresión relativa del receptor de PRL a nivel de ARNm y sus isoformas, determinada mediante PCR tiempo real y B) Expresión relativa del receptor de PRL a nivel proteína, determinada mediante citometría de flujo. El histograma muestra las células WEHI-231 receptor de PRL positivas, el pico blanco representa el isotipo control mientras que la banda gris representa la línea celular determinada.

Se realizó la purificación de las células WEHI-231 receptor de PRL positivas mediante citometría de flujo (Figura 9) obtenido purezas entre el 95-98%. Los ensayos posteriores de apoptosis se realizaron con estas células.

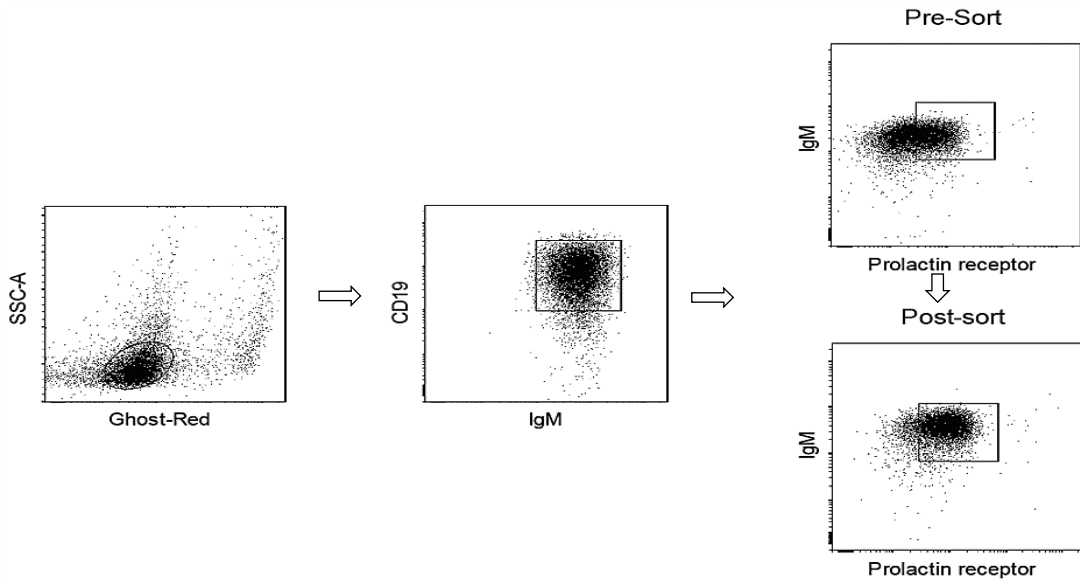


Figura 9. Purificación de las células WEHI-231 receptor de PRL+. Mediante citometría de flujo se realizó la purificación de las células WEHI-231 positivas para el receptor de PRL. El Dot Plot muestra la selección de las células CD19⁺, IgM⁺, Ghost-Red⁻ receptor de PRL⁺, mediante el marcaje con anticuerpos.

Efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis de las células WEHI-231.

Los linfocitos B inmaduros son constantemente sujetos a mecanismos de selección negativa para la eliminación de clones auto-reactivos. Para determinar el efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis en las células WEHI-231, las células fueron pre-incubadas 1 hora con PRL (50ng/mL) y 48 horas con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ para inducir entrecruzamiento del BCR, lo cual mimetiza el entrecruzamiento de antígenos propios. El porcentaje de células vivas y en apoptosis fue determinado mediante citometría de flujo. Las células que fueron incubadas con anti-IgM F(ab')₂ mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células vivas (40.93±0.87%; p<0.01) comparada con las células incubadas con medio (65.72±1.96%) o PRL (67.10±5.90%).

Mientras que las células que fueron pre-incubadas con PRL e incubada con anti-IgM F(ab')₂ mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células vivas (58.42±0.82%; p<0.01) comparado con las células que no fueron pre-incubadas con PRL (Figura 10).

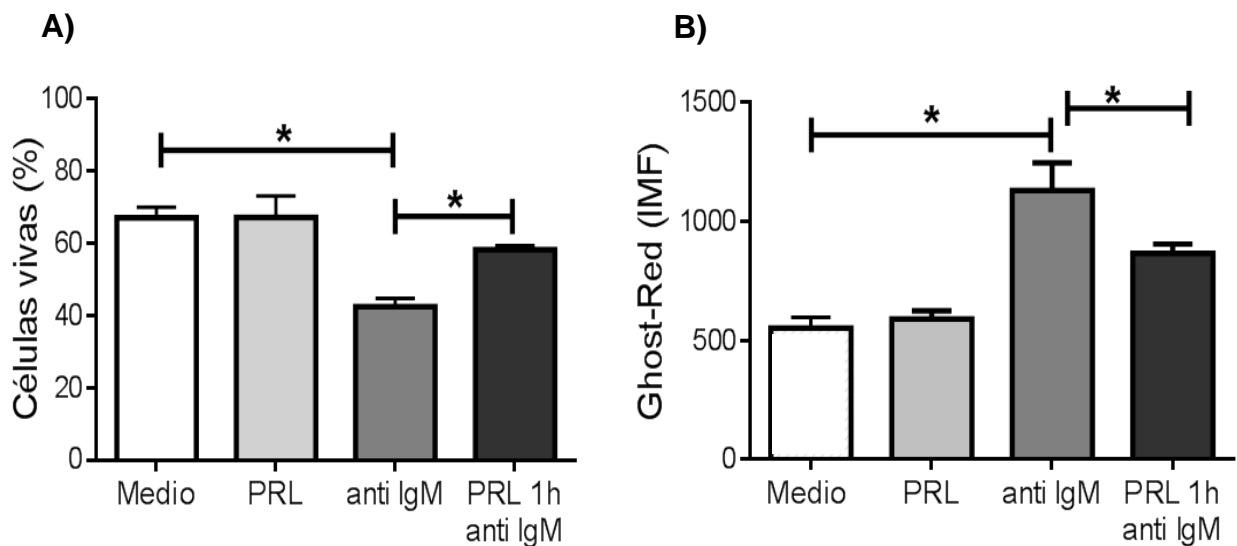


Figura 10. Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti IgM F(ab')₂ por 48 horas. Las células muertas fueron marcadas con Ghost-Red. A) Porcentaje de células vivas y B) IMF Ghost-Red. (*p<0.01).

Las células en apoptosis fueron determinadas mediante dos diferentes parámetros: 1) Anexina V y Ghost-Red (marcador de sobrevida) y 2) caspasa-3 activa. El porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V⁺ Ghost-Red⁻) y apoptosis tardía (Anexina V⁺ Ghost-Red⁺) incremento significativamente en las células incubadas con anti-IgM F(ab')₂ (23.88±2.56, 31.62±2.66%; p<0.01) comparado con el porcentaje de células incubadas con medio (16.23±2.02, 14.28±0.71%) o PRL (15.37±0.97, 13.0±0.44%). Una disminución significativa en el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía

(14.44 ± 0.99 , $21.92 \pm 2.00\%$; $p < 0.01$) fue determinada en las células pre-incubadas con PRL e incubadas con anti-IgM $F(ab')_2$ comparada con las células que no fueron pre-incubadas con PRL (Figura 11).

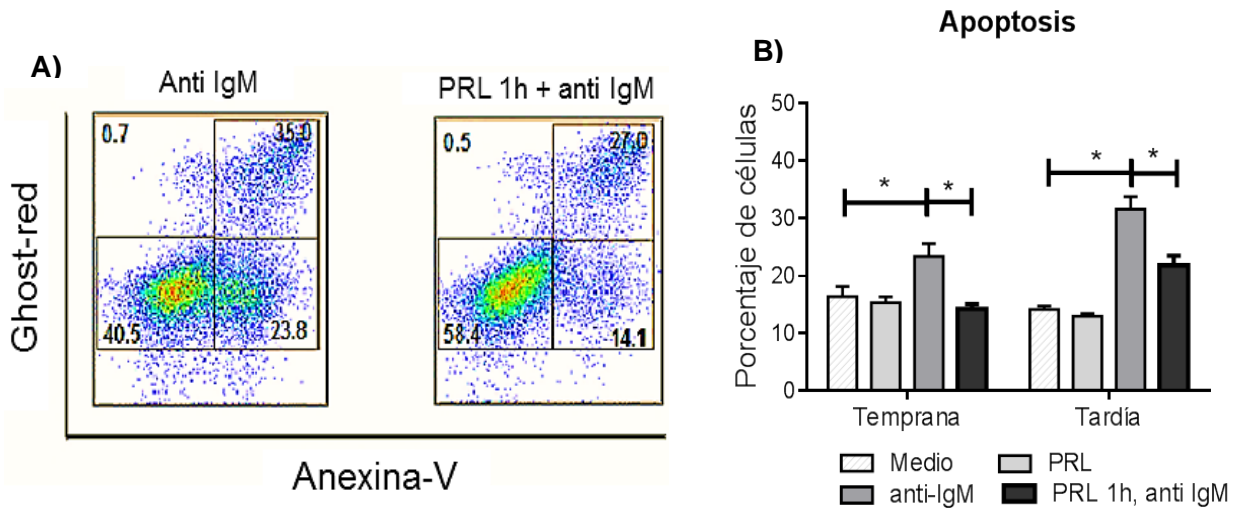


Figura 11. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por Anexina V. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti IgM $F(ab')_2$ por 48 horas. Las células fueron marcadas con Ghost-Red y Anexina V-FITC para medir la apoptosis temprana (Anexina V⁺ Ghost-Red⁻) y apoptosis tardía (Anexina V⁺ Ghost-Red⁺). A) Dot-Plot representativo del marcaje con Anexina V y Ghost-Red y B) Porcentaje de células en apoptosis. (* $p < 0.01$)

Por otro lado, el porcentaje de células caspasa-3 activa incrementó significativamente en las células que fueron incubadas con anti-IgM $F(ab')_2$ ($50.76 \pm 1.35\%$; $p < 0.01$) comparado con las células incubadas con medio ($9.99 \pm 0.33\%$) o PRL ($11.0 \pm 0.44\%$). Mientras que el porcentaje de células caspasa-3 activa disminuyó significativamente en las células pre-incubadas con PRL e incubadas con anti-IgM $F(ab')_2$ ($29.50 \pm 1.93\%$; $p < 0.01$) comparado con las células que no fueron pre-incubadas con PRL. Las mismas diferencias fueron encontradas al determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF) [(Medio

197.5±22.4; PRL 185.3±11.68; anti-IgM F(ab')₂ 342.2±35.9; PRL 1 hora y anti-IgM F(ab')₂ 292.3±11.4] (Figura 12).

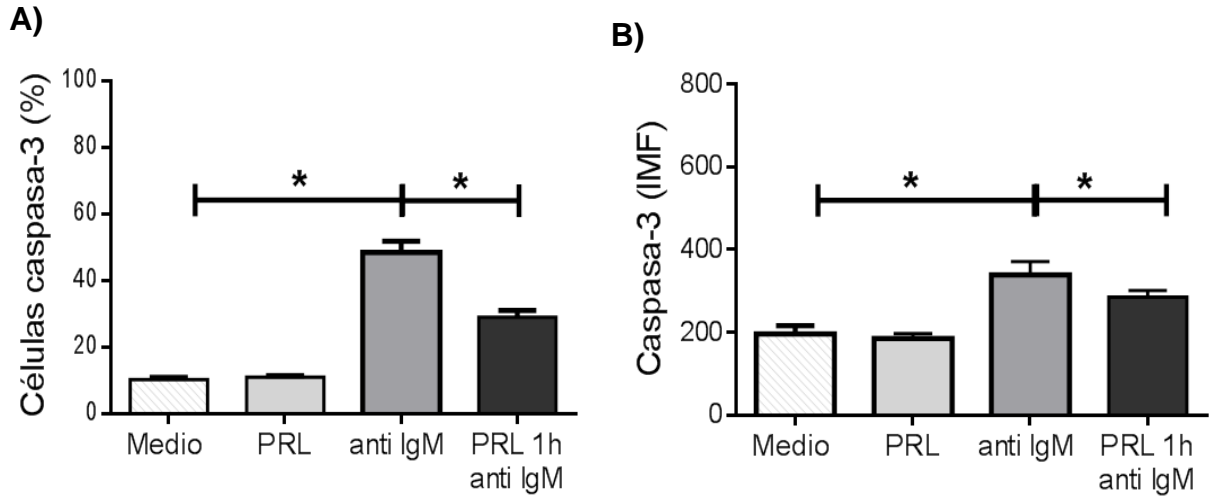


Figura 12. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti IgM F(ab')₂ por 48 horas. Las células fueron marcadas con Ghost-Red y un anticuerpo anti-caspasa-3 activa. A) Porcentaje de células caspasa-3 activa y B) IMF de caspasa-3 activa(*p<0.01)

DISCUSIÓN

Durante el proceso de maduración de los linfocitos B existen diferentes puntos donde se elimina las clonas auto-reactivas, en médula ósea un punto importante para la eliminación de estas clonas se da en el estadio de linfocito B inmaduro.^{17,22} Cuando falla la eliminación de las clonas auto-reactivas se favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes como LES.³⁰ En ratones que desarrollan LES (MRL, MRL/lpr) el aumento de los niveles séricos de PRL exacerba las manifestaciones de la enfermedad.⁶² Por otra parte, estudios previos demostraron que todos los estadios de maduración del linfocito B en médula ósea y bazo expresan el receptor de PRL tanto en ratones control (C57BL/6) como en ratones que desarrollan la enfermedad.⁶²⁻⁶³

En ratón existen 4 diferentes isoformas del receptor de PRL (una larga y 3 cortas) (45) las cuales activan diferentes vías de señalización⁴⁵⁻⁴⁶ y pueden tener diferente función. En estudios realizados en humanos se observó que la isoforma larga está asociada con la progresión y metástasis en cáncer de mama,⁶⁴ promoviendo la proliferación y supervivencia de las células cancerosas; mientras que la isoforma corta está asociada con efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos.⁶⁵ Actualmente se sabe que los linfocitos B expresan el receptor de PRL,⁶² sin embargo, aún se desconoce el tipo de isoforma que expresan, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la isoforma que expresan los linfocitos B de médula ósea. Nuestros resultados mostraron que los linfocitos B provenientes de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros) de ratones C57BL/6 y MRL de 9 semanas solo expresan la isoforma larga, observándose un patrón de expresión diferente entre la cepa control y la que desarrolla LES. Al encontrar un patrón diferente en la expresión del receptor entre la cepa control y la que desarrolla LES,

sugiere que la PRL además de intervenir en el desarrollo de las células B podría intervenir en la aparición de LES, al promover la proliferación y supervivencia como se menciona anteriormente. Para determinar si los linfocitos B provenientes de ratones MRL con las manifestaciones de la enfermedad expresan la misma isoforma (larga), los ratones fueron tratados con metoclopramida para incrementar los niveles séricos de PRL y exacerbar las manifestaciones de la enfermedad⁴⁰⁻⁴¹ (Anexo), encontrando que al igual que en los ratones de 9 semanas de edad (sin manifestaciones de la enfermedad) solo se detectó la isoforma larga, y que en los ratones MRL como en los ratones control (C57BL/6) solamente presentaron la isoforma larga en los linfocitos B de médula ósea tanto en los ratones de 9 semanas como en los ratones donde se incrementaron los niveles séricos de PRL; demostrando que los linfocitos B de médula ósea solo expresan la isoforma larga del receptor de PRL.

La isoforma larga del receptor de PRL es capaz de activar las vías de señalización Jak/Stat, PI3K/Akt y MAPK. La vía de señalización Jak/Stat es capaz de modular la expresión de genes apoptóticos de la familia Bcl-2; en un modelo de artritis se describió que la vía Jak2/Stat3 es capaz de activar la transcripción de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y rescatar de la apoptosis a condrocitos.^{45,66} En estudios previos en ratones que desarrollan LES se demostró que el aumento de los niveles séricos de PRL disminuye el número absoluto de linfocitos B inmaduros e incrementa el número absoluto de linfocitos B T1,⁶² sabiendo que en el estadio de linfocito B inmaduro se eliminan los linfocitos B auto-reactivos,²² sugerimos que la PRL podría estar salvando a las clonas autoreactivas de linfocitos B inmaduros y permitiendo su maduración a linfocitos B T1, ya que algunas publicaciones demostraron que linfocitos B de bazo al ser tratados con PRL son más

resistentes a la apoptosis en ratones B6.Sle.3,^{62,67} incrementando la expresión de moléculas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2.³⁸ Por lo que decidimos determinar el efecto que tiene la PRL en la sobrevivencia de linfocitos B inmaduros; para lo cual empleamos la línea celular WEHI-231.

La línea celular de ratón WEHI-231 presentan un fenotipo de linfocito B inmaduro y tienen la característica que al entrecruzar su BCR estas células son eliminadas por apoptosis;²⁷⁻²⁹ lo cual mimetiza la interacción del BCR con antígenos propios.²⁹

Nuestros resultados demostraron que las células WEHI-231 expresan el receptor de PRL y al igual que en los linfocitos B inmaduros de ratón solo expresan el ARNm de la isoforma larga. Además, que la interacción entre la PRL y su receptor incrementa la sobrevivencia de estas células a través de una disminución en la apoptosis inducida por el entrecruzamiento del BCR. Nuestros resultados junto con lo reportado previamente en células Nb2,⁶⁸ donde la PRL salva a las células de la apoptosis mediada por dexametasona a través de la expresión del gen Bcl-xL, y en células de cáncer de mama donde la PRL incrementa expresión de bcl-2 tanto a nivel de ARNm y de proteína, demuestran que la PRL es capaz de rescatar a las células de la apoptosis al incrementar la expresión de genes anti-apoptóticos.

Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para poder determinar la vía de señalización que está promoviendo la interacción PRL-receptor en las células WEHI-231 para rescatarlas de la apoptosis.

CONCLUSIONES

- Los linfocitos B de médula ósea expresan la isoforma larga del receptor de PRL.
- El patrón de expresión de la isoforma larga del receptor de PRL es diferente entre la cepa control y la cepa que desarrolla LES.
- Las células WEHI-231 expresan la isoforma larga del receptor de PRL.
- La prolactina rescata de la apoptosis inducida por entrecruzamiento del BCR a las células WEHI-231.

REFERENCIAS

1. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(2):107–116.
2. Clark M, Mandal M, Ochiai K, Singh H. Orchestrating B cell Lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(2):69- 80.
3. Northrup D, Allman D. Transcriptional regulation of early B cell development. *Immunol Res*. 2008; 42(1-3):106-117.
4. Mandel E, Grosschedl R. Transcription control of early B cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(2):161–167.
5. Nutt S, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 2007; 26(6):715–725.
6. Barneda B, Roman L, Collazo O, Mahmoudi T, Parra M. Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming. *Comp Funct Genomics*. 2012; 2012:1-11.
7. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:595–621.
8. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signalling and fate decision. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:21–55.
9. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131(4):959-971.
10. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V (D)J

- recombination. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(4):251-263.
11. Hobeika E, Maity PC, Jumaa H. Control of B cell responsiveness by isotype and structural elements of the antigen receptor. *Trends Immunol.* 2016; 37(5):310-20.
 12. Thomas MD, Srivastava B, Allman D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 2006; 239(2):92–102.
 13. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immunocompetence. *Trends Immunol.* 2003; 24(6):342-348.
 14. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(2):149–157.
 15. Tussiwand R, Bosco N, Ceredig R, Rolink AG. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol.* 2009; 39(9):2317–2324.
 16. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(6):632-638.
 17. Von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2010; 11(1):14-20.
 18. Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14 Suppl 4:S1.
 19. Pelanda R, Torres RM. Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(4):1-15.
 20. Köhler F, Hug E, Eschbach C, Meixlsperger S, Hobeika E, Kofer J, et al. Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells. *Immunity.* 2008; 29(6):912-21.
 21. Ding C, Yan J. Regulation of autoreactive B cells: checkpoints and activation. *Arch*

- Immunol Ther Exp (Warsz). 2007; 55(2):83-9.
22. Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. Immunol. 2003; 110(4):411-20.
23. Fuentes-Pananá EM, Bannish G, Monroe JG. Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. Immunol Rev. 2004; 197:26-40.
24. Takada E, Toyota H, Suzuki J, Mizuguchi J. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. J Immunol. 2001; 166(3):1641-9.
25. Spillmann FJ, Wabl M. Endogenous expression of activation-induced cytidine deaminase in cell line WEHI-231. J Immunol. 2004; 173(3):1858-67.
26. Prijatelj M, Celhar T, Mlinaric-Rascan I. Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011; 95(1-4):19-26.
27. Gold MR, Gajewski TF, DeFranco AL. Regulation of anti-immunoglobulin-induced B lymphoma growth arrest by transforming growth factor beta 1 and dexamethasone. Int Immunol. 1991; 3(11):1091-8.
28. Tanabe K, Inui S. Dominant negative form of alpha4 inhibits the BCR crosslinking-induced phosphorylation of Bcl-xL and apoptosis in an immature B cell line WEHI-231. Biomed Res. 2015; 36(2):97-102.
29. Gottschalk AR, Quintáns J. Apoptosis in B lymphocytes: the WEHI-231 perspective. Immunol Cell Biol. 1995; 73(1):8-16.

30. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56(7):481–490.
31. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005; 201(5):703-711.
32. Lamoureux JL, Watson LC, Cherrier M, Skog P, Nemazee D, Feeney AJ. Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J Exp Med.* 2007; 204(12):2853-2864.
33. Dörner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods.* 2011; 363(2):187-197.
34. Crampton SP, Morawski PA, Bolland S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Dis Model Mech.* 2014; 7(9):1033-46.
35. Furukawa F, Yoshimasu T. Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005; 4(6):345-350.
36. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:1-19.
37. Petri M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008; 17(5):412-415.
38. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimm Rev.* 2012; 11(6-7):A465-A470.
39. Cohen J, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez D, Grimaldi C, Diamond B. Hormonal regulation of B cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008; 17(6):528-532.

40. Blanco F, Quintal G, Leaños A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J Rheumatol.* 1999; 26(1):55-59.
41. Leaños A, Pascoe D, Chávez K, Blanco F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2619-2624.
42. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000; 80(4):1523-1587.
43. Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63(5):435-43.
44. Newey P, Gorvin C, Cleland S, Willberg C, Bridge M, Azharuddin M, et al. Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia. *N Engl J Med.* 2013; 369(21):2012–2020.
45. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. New insights in prolactin: pathological implications. *Nature Rev Endocrinol.* 2015; 11(5):265-75.
46. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010; 21(6):362-368.
47. Touraine P, Leite de Moraes MC, Dardenne M, Kelly PA. Expression of short and long forms of prolactin receptor in murine lymphoid tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 104(2):183-90.
48. Smith P. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac Rec.* 1939; 47:119-129.

49. Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacol.* 1983; 6(3):231-43.
50. De Laurentiis A, Pisera D, Caruso C, Candolfi M, Mohn C, Rettori V, Seilicovich A. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic pituitary axis. *Neuroimmunomod.* 2002; 10(1):30-39.
51. Horiguchi K, Yagi S, Ono K, Nishiura Y, Tanaka M, Ishida M, et al. Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *J Endocrinol.* 2004; 183(3):639-646.
52. Chávez K, Hernández J, Zenteno E, Leaños A, Legorreta M, Blanco F. 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):182- 191.
53. Carreño PC, Sacedón R, Jiménez E, Vicente A, Zapata AG. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J Neuroimmunol.* 2005; 160(1-2):135-145.
54. Morales P, Carretero M, Geronimo H, Copín S, Gaspar M, Marcos M, Martín J. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Differ.* 1999; 10(8):583-590.
55. Sun R, Gault R, Welniak L, Tian Z, Richards S, Murphy W. Immunologic and hematopoietic effects of recombinant human prolactin after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9(7):426-434.
56. Horseman N, Zhao W, Montecino E, Tanaka M, Nakashima K, Engle S, et al. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted

- disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 1997; 16(23):6926-6935.
57. Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP, Kelly PA. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol.* 1999; 163(2):576-582.
58. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2006; 6(8):537-542.
59. Pacilio M, Migliaresis S, Meli R, Ambrosone L, Bigliardo B, Di Carlo R. Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus association with disease activity. *J Rheumatol.* 2001; 28(10):2216-2221.
60. McMurray R, Keisler D, Kanuckel K, Izui S. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol.* 1991; 147(11):3780-7.
61. McMurray RW. Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001; 10(10):742-74.
62. Ledesma Y, Blanco F, Fuentes E, Tesoro E, Hernández R, Arriaga L, Legorreta M, et al. Higher levels of PRL receptor in Transitional 1 B cells correlates with increased numbers of this population after PRL treatment and an early onset of lupus symptoms. *BMC Immunology.* 2012; 13:11.
63. Legorreta M, Flores R, Blanco F, Fuentes E, Chávez L, Chávez K, et al. Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:287469.
64. Meng J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(16):5677-82.

65. Yonezawa T, Chen KH, Ghosh MK, Rivera L, Dill R, Ma L, et al. Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Lett.* 2015; 366(1):84-92.
66. Adán N, Guzmán J, Ledesma MG, Perales SI, Quintanar A, López F, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2013; 123(9):3902-13.
67. Peeva E, Gonzalez J, Hicks R, Diamond B. Cutting edge: lupus susceptibility interval *Sle3/5* confers responsiveness to prolactin in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2006; 177(3):1401-1405.
68. Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley D, Buckley AR. 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):265-73.

ANEXO

Inducción de hiperprolactinemia.

Se formaron tres grupos por cada cepa de ratón con los siguientes tratamientos: I) ratones de 9 semanas sin tratamiento, II) ratones tratados con 100µL de PBS estéril (PISA, México) y III) 100µL de metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 2mg/mL disuelta en PBS. Cada grupo se conformó de ocho ratones. La administración del tratamiento se realizó durante 6 semanas por vía subcutánea (SC), llevando a cabo la administración por las mañanas de lunes a viernes. Se tomaron muestras de sangre al inicio (9 semanas de edad) y al término del tratamiento (15 semanas de edad) para determinar las concentraciones séricas de PRL y de anticuerpos anti-ADNs (Figura 13).

Figura 13. Tabla de Concentraciones séricas de PRL y ab anti-ADNs antes y después de tratamiento con Metoclopramida y PBS.

Cepa	C57BL/6			MRL		
	9semanas	PBS	HiperPR	9 semanas	PBS	HiperPR
PRL (ng/mL)	4.20±1.38	3.80±1.18	10.70±1.23*	12.58±1.99	11.2±1.81	26.27±2.69*
ab anti-ADNs (µg/mL)	0	0	0	0	5.94±1.98*	22.96±11*

HyperPRL Hyperprolactinemia

*ANOVA, p<0.05

Purificación de poblaciones de linfocitos B de médula ósea.

La purificación de los linfocitos B de médula ósea se realizó por selección positiva. Para lo cual las células provenientes de médula ósea se incubaron con anticuerpo anti-B220 conjugado a perlas magnéticas 10µL por cada 10x10⁶ de células (Miltenyi Biotec, USA) en PBS-BSA 0.5% EDTA 2 mM a 4°C por 15 minutos, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, USA), los linfocitos B purificados se incubaron a 4°C por 20 minutos con los siguientes anticuerpos: 5µL de anti-B220-PE, 5µL de anti-CD23-PECy7, 5µL de anti-IgM-APC, 5µL de anti-CD43-FITC, así como con 5µL de DAPI 1mg/mL (Sigma Aldrich, USA) para seleccionar células vivas. La purificación de las poblaciones linfocitos B se realizó por citometría de flujo utilizando un citometro FACSAria con software FACSDiva v6.x (BD Bioscience), obteniendo purezas mayores del 95% (Figura14).

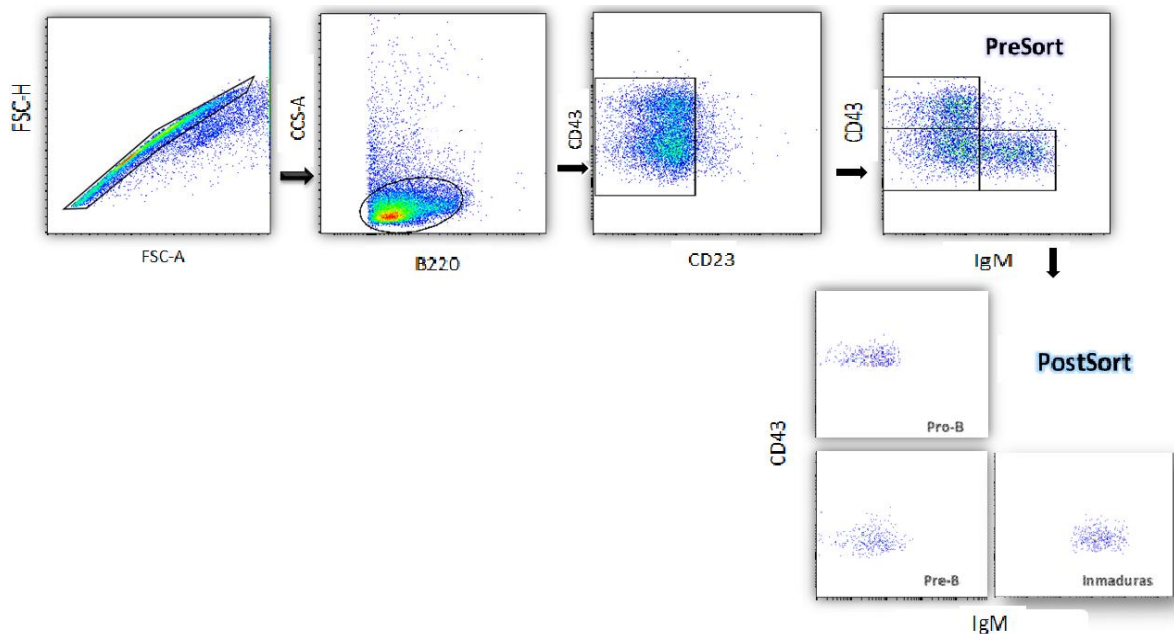


Figura 14. Purificación de las poblaciones de linfocitos B de médula ósea. –La figura representa la selección de los linfocitos Pro-B, Pre-B e Inmaduros mediante el marcaje con los anticuerpos anti: CD43, CD23, B220, IgM. Las purezas obtenidas fueron mayores de 95%.

Amplificación de las isoformas del receptor de PRL

Como control de la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL se utilizó la línea celular EpH4 proveniente de células de cáncer de mama de ratón. La línea celular fue mantenida y tratada igual que la línea celular WEHI-231 y la expresión de las isoformas se determinó por PCR tiempo real.

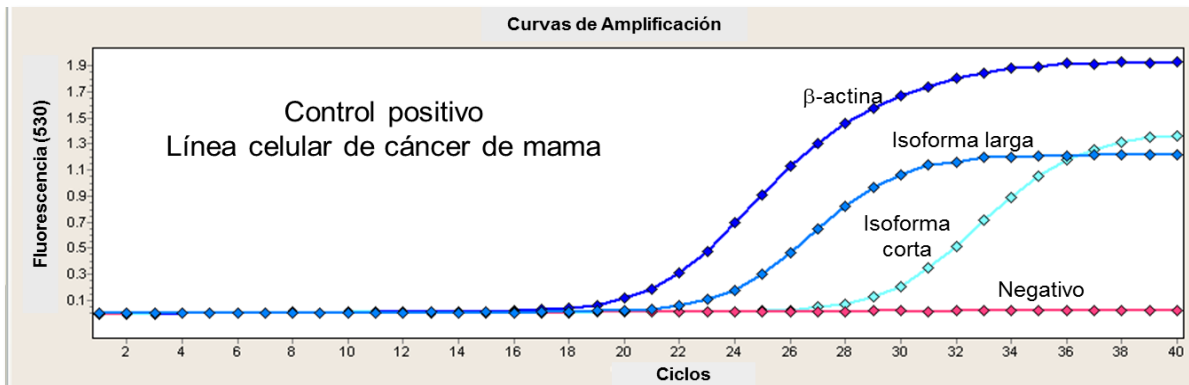


Figura 15. Amplificación de las isoformas del receptor de PRL. En la figura se representa la expresión de la amplificación de ambas isoformas (larga y corta) en una línea celular (Eph4) que fue tomada como control positivo (Eph4). Las líneas punteadas representan las curvas de amplificación obtenidas a partir de PCR tiempo real.