



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN
DIFERENTES POBLACIONES DE LINFOCITOS T EN
RATONES QUE DESARROLLAN UNA ENFERMEDAD
SIMILAR A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

YOLANDA PATRICIA ALEMÁN GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ADRIANA KARINA
CHÁVEZ RUEDA

ASESOR DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA
UGALDE



CIUDAD DE MÉXICO

2017



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.

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, bajo la dirección académica de la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (150766) y del Fondo de Investigación en Salud (IMSS/PROT/G16/1594), en colaboración con el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), bajo la dirección de la Dra. Patricia Gorocica Rosete. El mantenimiento de los animales de estudio se llevó a cabo en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme un recinto y profesores que me ayudaron a concluir mi carrera.

A la Dra. Karina Chávez Rueda quien me apoyó a finalizar mis estudios, me brindó un espacio para elaborar esta tesis, me compartió sus conocimientos.

A la M. en C. Rosa Elba Galván Duarte que además de ser mi maestra en la carrera, me aconsejó para crecer como persona y como profesionista.

A la Dra. Raquel Retana por ser una gran profesora y aceptar ser mi asesora de tesis.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y apoyo en todo momento.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Yolanda e Hilario, y mi abuela Concepción, quienes me apoyaron moral y económicamente en todo momento, sin ellos no podría haber logrado tanto.

A mi hermana Karla, quien es el más grande de mis apoyos y me ha cuidado toda mi vida, alentándome a ser mejor persona y lograr todas mis metas. Te amo hermana.

A Rodrigo Illanes por estar en los mejores y peores momentos, ayudándome a seguir adelante.

Y por último a mis amigos de la universidad que siempre estuvieron a mi lado: Omar, Alejandra, Arely, Christian y Gabriela.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	- 1 -
MARCO TEÓRICO	- 2 -
LINFOCITOS T	- 2 -
Función de las células T en el sistema inmune.....	- 3 -
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	- 5 -
HORMONAS EN LA INMUNIDAD.....	- 7 -
Prolactina	- 8 -
Receptor de prolactina	- 9 -
Prolactina en LES.....	- 12 -
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 14 -
HIPÓTESIS.....	- 15 -
OBJETIVO	- 15 -
Objetivos particulares	- 15 -
MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 16 -
Tipo de estudio.....	- 16 -
Universo de estudio.....	- 16 -
Variables	- 16 -
TÉCNICAS.....	- 17 -
Determinación de proteinuria.....	- 17 -
ELISA para anticuerpos IgG anti ds-DNA	- 17 -
Obtención de células de bazo	- 17 -
Tinción del receptor de prolactina.....	- 18 -
Determinación de citocinas.....	- 18 -
Análisis estadístico.....	- 19 -
RESULTADOS.....	- 20 -
Determinación de proteinuria y anticuerpos anti-dsDNA.....	- 20 -
Comparación de poblaciones de linfocitos.....	- 21 -
Expresión del receptor de prolactina en diferentes poblaciones de linfocitos	- 28 -
DISCUSIÓN.....	- 31 -
CONCLUSIONES	- 35 -
PERSPECTIVAS	- 36 -
REFERENCIAS	- 37 -

INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica degenerativa en la cual existen diferentes poblaciones de linfocitos T auto-reactivos que intervienen en su patogenia, los cuales presentan anormalidades en su activación, producción de citocinas y diferenciación a células de memoria.

Esta enfermedad es más frecuente en mujeres por lo que se ha asociado con la participación de distintas hormonas, una de ellas es la prolactina. Diversos estudios han reportado un incremento en los niveles séricos de prolactina en pacientes con LES activo.

Se ha descrito que esta hormona interviene en la activación de los linfocitos T y B, e incrementan su proliferación. También se ha demostrado que estos linfocitos expresan el receptor de prolactina.

Debido a esto, la búsqueda de la expresión del receptor de prolactina en distintas poblaciones de linfocitos T, caracterizadas por la tinción de sus marcadores de superficie con anticuerpos fluorescentes y analizadas por citometría de flujo, provenientes de dos modelos de ratón: C57BL/6 el cual es utilizado como grupo control y lpr/MRL que desarrolla LES de forma espontánea, podría ayudar a comprender el papel de la hormona en la enfermedad.

MARCO TEÓRICO

LINFOCITOS T

En médula ósea las células troncales (HSC) se diferencian a progenitores linfoides tempranos (ELP) que dan lugar a los progenitores linfoides común (CLP), los cuales migran de la médula ósea hacia el timo donde proliferan, se diferencian y pasan por procesos de selección que da lugar al desarrollo del linfocito T maduro.

Los CPL llegan al timo a través de los receptores de quimiocinas, pero siguen teniendo el potencial para dar lugar a más de un tipo de célula (NK, dendríticas), para que estos progenitores queden comprometidos por completo al linaje de T se necesitan diferentes señales, como la del receptor Notch (receptor asociado con el desarrollo de células embrionarias). Una vez en la corteza tímica los timocitos expresan sobre su superficie un complejo multiprotéico llamado receptor de linfocitos T (TCR). Éste se genera por la recombinación somática de los genes VJ de la cadena α y VDJ de la cadena β que se encuentran en los cromosomas 14 y 6 en los ratones, seguida de una proliferación y coexpresión de CD4 y CD8, conocidos como timocitos doble positivos (DP). Los timocitos DP al migrar hacia la unión corticomedular interactúan con las células epiteliales, las cuales expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En este punto se da una selección positiva en la cual se seleccionan a los linfocitos con un TCR funcional, además de una diferenciación a linfocitos T CD4⁺, si se unen a moléculas del MHC-II, o linfocitos T CD8⁺, si se unen a moléculas del MHC-I. Los linfocitos simples positivos (SP) son dirigidos en forma quimiotáctica a la médula del timo donde interaccionan con macrófagos y células dendríticas que expresan el complejo

MHC/péptidos propios. Los linfocitos cuyo TCR reconoce con alta afinidad el complejo (MHC/péptido) son eliminados por apoptosis, dando lugar a una selección negativa, aunque algunas clonas autorreactivas salen a la periferia constituyendo un riesgo para el desarrollo de autoinmunidad. Finalmente, los linfocitos T “naive” migran del timo por la circulación periférica a los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas) donde interactúan con las células dendríticas a fin de reconocer los péptidos antigénicos presentados por las moléculas del MHC, si reconocen estos péptidos, las células se activan, se expanden (expansión clonal) y se diferencian en linfocitos T efectores.^{1, 2}

Función de las células T en el sistema inmune.

Los linfocitos T CD4⁺ efectores pueden dividirse en Th1, Th2, Treg y Th17 basados en el patrón de secreción de citocinas y el factor de transcripción que expresan. Los linfocitos Th1 producen interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN- γ), TNF α (factor de necrosis tumoral) y TNF- β , y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción T-bet.¹ Favorecen la activación de los macrófagos para la eliminación de patógenos intracelulares, además de ayudar a los linfocitos T citotóxicos a convertirse en linfocitos efectores para que lisen las células dianas infectadas por virus.³

Los linfocitos Th17 participan en la respuesta contra microorganismos extracelulares y hongos, para su diferenciación a partir de los linfocitos T “naive” se necesitan las citocinas TGF- β e IL-6. Se caracterizan por la producción de IL-17 e IL-21. Desempeñan una función importante en mantener la integridad de las superficies mucosas.¹ Las células Th17 expresan un factor de transcripción único ROR γ t.⁴

La familia de citocinas IL-17 exhibe un amplio espectro de acciones, incluida la capacidad de inducir la producción de molécula causantes de inflamación y daño al tejido.

En particular, la IL-17A es capaz de estimular la producción de quimiocinas y citocinas de múltiples células, como las células epiteliales y los fibroblastos, y de promover la proliferación, maduración y reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos a través de la inducción de quimiocinas y factores estimulantes de colonias.⁵

Los linfocitos Th2 son productores de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Además, estimulan eficazmente a los linfocitos B para que proliferen y produzcan anticuerpos (en especial IgE y algunas subclases de IgG); actúan frente a parásitos extracelulares.^{1, 6}

Los linfocitos T reguladores (Treg) ayudan a controlar el desarrollo de las respuestas inmunitarias y limita la respuesta contra los tejidos propios. Pueden inhibir la proliferación de otras poblaciones de células T. Expresan sobre su superficie CD4 así como CD25, pero son identificadas de manera más definitiva por su expresión de un regulador transcripcional maestro, FoxP3.⁶ Se han identificado diversas subpoblaciones de linfocitos Treg que difieren en características fenotípicas o en su origen. Los linfocitos Treg naturales (nTreg) se diferencian cuando su TCR reconoce a antígenos propios con una afinidad intermedia en timo. Por otra parte, los linfocitos Treg inducidos (iTreg) son el resultado de estimulación apropiada del receptor de linfocito T “naive” y un microambiente particular de citocinas (TGF- β , IL-2) en los órganos linfoides secundarios.⁷ Esta población constituye de un 5 a 10% del total de linfocitos T CD4⁺ en ratones sanos.⁸

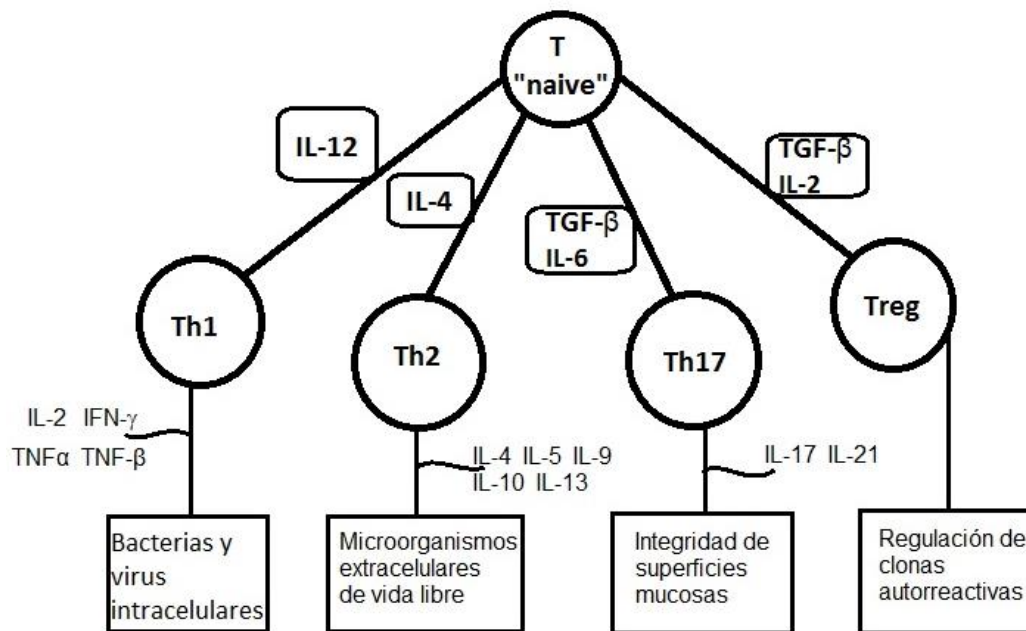


Figura 1. Función de los linfocitos Th en el sistema inmune. (Modificado de: López M.)⁹

En las inmunopatologías, como son las respuestas alérgicas, los linfomas o la autoinmunidad, los linfocitos Th1, Th2 y Th17 se encuentran implicados debido a que presentan un incremento en su actividad.¹⁰ En las enfermedades autoinmunes se ha demostrado que las citocinas secretadas por los diferentes subtipos de linfocitos T CD4⁺, juegan un papel importante en su patología.⁶

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad crónica autoinmune de etiología desconocida que puede afectar cualquier órgano o sistema. Se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, inmunológicos, ambientales y hormonales tienen una estrecha interacción para que se desarrolle la enfermedad.¹¹

Las principales manifestaciones clínicas son los exantemas, la artritis y la glomerulonefritis. Se encuentran diferentes auto-anticuerpos, dirigidos contra diversas moléculas del núcleo como el DNA, RNA, Ro, La e histonas. Los inmunocomplejos formados a partir de los autoanticuerpos y sus antígenos específicos son responsables de la glomerulonefritis, artritis y vasculitis.¹²

Para el estudio de esta enfermedad, los investigadores han desarrollado cepas que espontáneamente presentan síntomas de LES que se asemejan a la enfermedad humana, a través de varias generaciones de endogamia de distintas líneas de ratón. Los ratones provenientes de la primera generación de la cruce entre las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW), conocidos como NZB/NZW F1, desarrollan un síndrome similar a lupus caracterizado por linfadenopatía, esplenomegalia, títulos elevados de anticuerpos antinucleares y glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos. Los ratones MRL derivan de múltiples cruces de cepas consanguíneas LG/J, C3H/Di, C57BL/6 y AKR/J. Una mutación espontánea en el gen *Fas* ocurrida durante la endogamia causó linfoproliferación (fenotipo *lpr*), generando la cepa MRL/*lpr*. Estos animales demostraron hiperactividad de las células B, complejos inmunes circulantes, hiperplasia linfoide y glomerulonefritis. La inclusión de la mutación *lpr* incrementa la severidad de la enfermedad, provocando linfoproliferación.¹³

Tanto en los pacientes como en los modelos de ratón que desarrollan LES (NZB/NZW F1, MRL, MRL/*lpr*) se presentan defectos en los mecanismos de tolerancia dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B. Estas células presentan anomalías en su activación, producción de citocinas y diferenciación a células de memoria. Los linfocitos T CD4⁺ auto-reactivos

cooperan a través de sus moléculas co-estimuladoras y secreción de citocinas con los linfocitos B auto-reactivos para la producción de auto-anticuerpos, los cuales pueden formar complejos inmunes que con frecuencia salen de circulación y se depositan en el riñón, piel, cerebro entre otros tejidos causando inflamación y daño tisular.¹⁴

LES afecta predominantemente a mujeres principalmente durante la edad reproductiva, con una relación más baja antes de la pubertad y una disminución en la menopausia. Las diferencias entre los sexos pueden influir en la expresión clínica y serológica, el tratamiento y los resultados, siendo la proporción media entre mujeres y hombres de alrededor de 9:1.¹⁵

En pacientes con LES, tanto hombres como mujeres, se ha demostrado un metabolismo anormal de esteroides sexuales. Comparado con controles, la mujer con LES tiene niveles menores de andrógenos y niveles altos de estradiol y prolactina.¹⁶

HORMONAS EN LA INMUNIDAD

Existen diferencias entre las respuestas inmunes de hombres y mujeres; en general, las mujeres tienen una mejor inmunidad humoral y celular, también tienen una mayor resistencia a una variedad de infecciones. Estas observaciones implican la influencia de factores hormonales en la respuesta inmune.¹⁷

Las células del sistema inmune expresan receptores de estrógenos y andrógenos. En experimentos *in vitro* se ha probado si la expresión de estos receptores afecta la respuesta de los linfocitos. Los tratamientos con estrógenos aumentan la respuesta a antígenos de las células mononucleares de sangre periférica obtenidas de

mujeres. Contrariamente, la testosterona inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos, la producción de anticuerpos de las células B y la actividad citotóxica de las células NK.¹⁸

Prolactina

La prolactina es una hormona hipofisaria multifuncional con más de 300 funciones agrupadas en funciones reproductivas, metabólicas, osmoreguladoras e inmunoreguladoras. Es una hormona polipeptídica de 23 kDa, sintetizada y secretada principalmente por las células lactotropas de la adenohipófisis.¹⁹ Es miembro de la familia de la hormona del crecimiento (GH) y la hormona lactogénica (LH). Es una proteína globular de una sola cadena con 199 aminoácidos y tres puentes disulfuro intramoleculares (Cys 4-11, 58-174 y 191-199). El 50% de los aminoácidos en la cadena conforman una estructura secundaria de α -hélice.²⁰ (Figura 2)

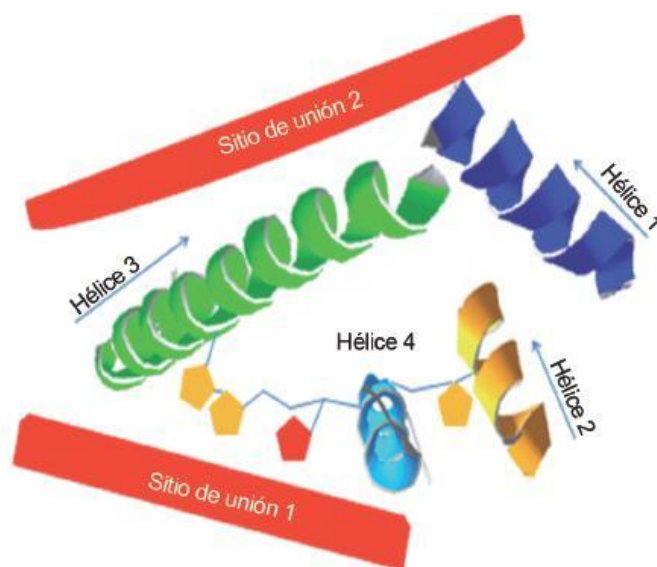


Figura 2. Estructura terciaria de la prolactina. Presenta cuatro dominios α -hélice y 2 sitios de unión al receptor. (Tomada de Blanco, F. 2012)²⁰

Además de ser sintetizada y secretada por las células lactotropas de la hipófisis, la prolactina puede ser producida por otras células y tejidos. Los principales son la decidua, células del sistema inmune, cerebro y miometrio, además existe evidencia de la síntesis de prolactina por la piel y glándulas exógenas, incluyendo las glándulas mamarias, sudoríparas y lagrimales.²¹

La prolactina hipofisaria actúa a través de una vía endócrina clásica, es secretada por una glándula, transportada por el sistema circulatorio y actúa sobre la célula diana a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática. La prolactina extrahipofisaria puede actuar como un factor de crecimiento, neurotransmisor o inmunomodulador, de manera autócrina o parácrina. Usando estas vías puede activar diversas acciones asociadas con la prolactina sin afectar la concentración circulante de esta hormona.²²

Receptor de prolactina

La acción de la prolactina está mediada por su receptor, el cual es expresado en las glándulas mamarias, gónadas, útero, cerebro, glándula hipofisaria, glándula adrenal, pulmón, corazón, hígado, músculo esquelético, piel y linfocitos.¹⁹

El receptor de prolactina pertenece a la subfamilia tipo I de los receptores de citocinas y presenta tres regiones: a) región extracelular, la cual une a la hormona, b) región transmembranal (~25 residuos) y c) región citoplasmática. Es encontrado en varias isoformas producidas por *splicing* diferencial del RNA o por escisión post-transcripcional.²³ En ratón se han identificado una isoforma larga y tres isoformas cortas, las cuales exhiben una región extracelular y transmembranal idéntica, mientras que la región intracelular presenta diferentes tamaños y composiciones,

dependiendo de la isoforma del receptor, las formas cortas solo difieren por unos cuantos aminoácidos en la parte citoplasmática.²² (Figura 3)

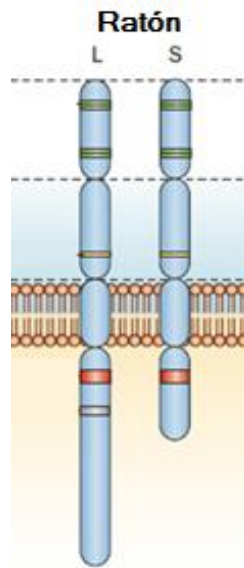


Figura 3. Isoformas del receptor de prolactina. (Tomada de: Bernard, V. 2015)²⁴

La activación del receptor de prolactina involucra la dimerización secuencial del receptor inducida por el ligando. Cada molécula de prolactina contiene dos sitios de unión. Primero el sitio de unión 1 de la prolactina interactúa con una molécula del receptor. La formación de este complejo hormona-receptor inicial es el prerrequisito para la interacción del sitio de unión 2 en la misma molécula de prolactina con una segunda molécula del receptor.²⁵ (Figura 4)

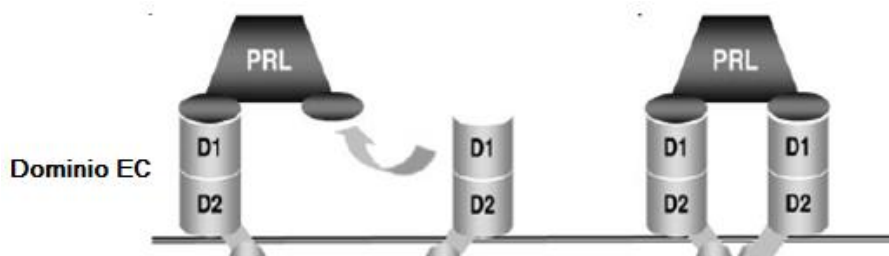


Figura 4. Mecanismo de activación del receptor de prolactina. (Tomada de: Freeman, M. 2000)²⁵

La zona proximal de la región intracelular está asociada constitutivamente con una tirosina cinasa denominada cinasa Janus 2 (Jak2).²⁵ La activación de Jak2 ocurre por transfosforilación y desencadena una vía de señalización dependiendo de la isoforma presente en la célula.²⁶ Si la PRL actúa a través de la isoforma larga, activa distintas cinasas, incluidas Jak2/Stat, Src cinasa, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt), proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y Nek3-vav2-Rac1. Sin embargo, la isoforma corta no activa Stat, pero puede activar las vías MAPK y PI3K (Figura 5).²⁷

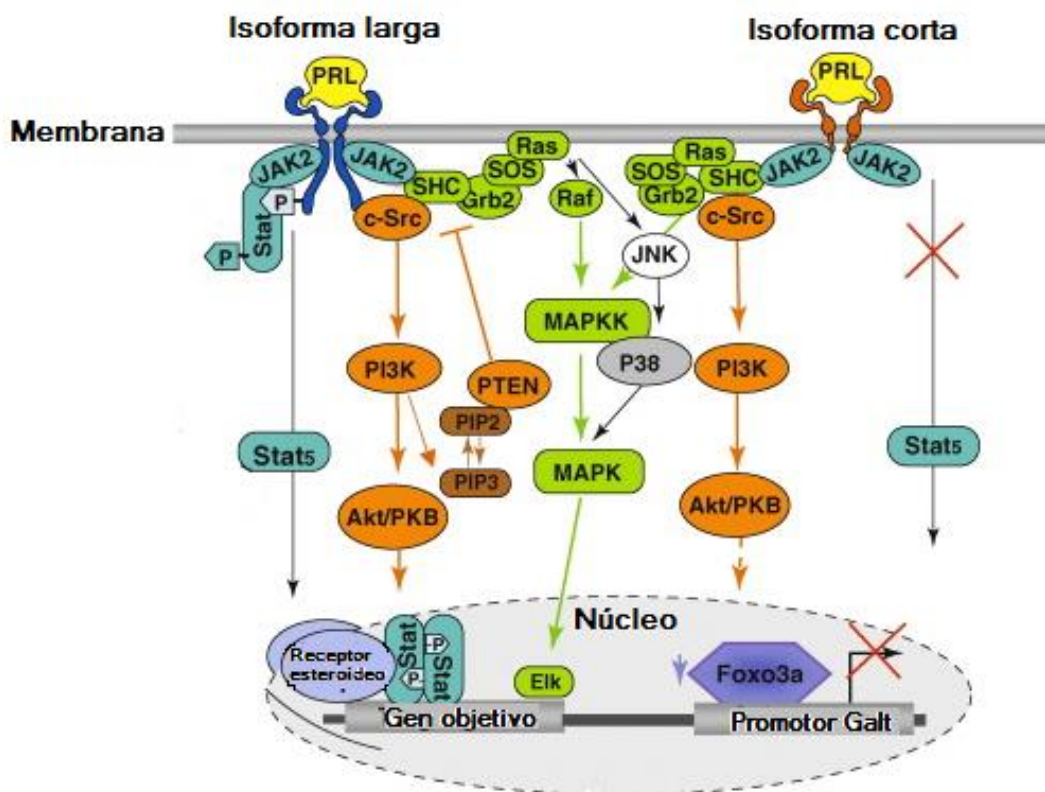


Figura 5. Principales vías de señalización provocadas por isoformas de PRLR largas y cortas. (Tomado de Binart, N. 2010)²⁷

Prolactina en LES

En enfermedades autoinmunes como LES, artritis reumatoide, esclerosis sistémica y el síndrome de Sjögren se ha observado hiperprolactinemia.²⁸ También se ha observado que estados de hiperprolactinemia, como embarazo o lactancia, desencadenan las erupciones de lupus, además de encontrarse frecuencias elevadas de hiperprolactinemia en hombres con LES.²⁹ Estos hallazgos también han sido observados en ratones NZB/NZW donde, después de inducirse un estado de hiperprolactinemia, se detectaron inmunocomplejos y proteinuria tempranos, y muerte acelerada. En ratones MRL/lpr el estado de hiperprolactinemia exacerba las manifestaciones de la enfermedad.³⁰ La prolactina influye en la función endócrina del timo, modula genes comprometidos con distintas actividades biológicas de su epitelio, además de presentar un efecto antiapoptótico en la línea celular Nb2 proveniente de linfoma tímico de rata.³¹ El receptor de prolactina es expresado en todos los linfocitos T y B. Diversos estudios han demostrado que la prolactina aumenta la activación de linfocitos T de diversas maneras. En linfocitos T CD4 activados con PMA se ha reportado que la PRL favorece la expresión de CD69 y CD154³², mientras que en T CD8 activados con fitohemaglutinina la PRL incrementa la expresión de CD69 y CD25.³³ La PRL también interviene en la secreción de IL-2 e IFN γ en linfocitos T CD4³², además de modular la expresión de T-bet en una línea celular de linfocitos T CD4.³⁴ Se ha demostrado que la expresión del receptor de PRL en las células T reguladoras (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}) se presenta de forma constitutiva mientras que en las células T efectoras es inducible cuando las células se estimulan con anti-CD3/CD28.³⁵ Por lo que resulta importante determinar la

expresión del receptor de PRL en las distintas poblaciones de linfocitos T asociados a LES.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de clonas auto-reactivas y la producción de auto-anticuerpos que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva, LES tiende a presentarse o exacerbarse durante el embarazo o en el periodo post-parto, condiciones que se acompañan de niveles elevados de hormonas, entre ellas la prolactina (PRL). El uso de modelos de ratón (NZB/NZW, MRL, MRL/lpr) que desarrollan una enfermedad semejante a lupus en el humano, han permitido entender mejor la patología de esta enfermedad. En estos modelos se ha demostrado una falla en la tolerancia central y periférica en los linfocitos T y B, que tiene como consecuencia la generación de clonas autorreactivas. También se ha demostrado que el incremento de los niveles séricos de PRL exacerba las manifestaciones del LES solamente en los ratones susceptibles a desarrollar la enfermedad, al igual que en pacientes con LES.

Además, se ha reportado que la PRL favorece la activación y proliferación de linfocitos T CD4.

Debido a la influencia de la prolactina en la proliferación de los linfocitos T, la búsqueda de su receptor en las distintas poblaciones asociadas a LES contribuye a una mejor comprensión de su papel en el desarrollo de la enfermedad y la exacerbación de sus síntomas.

De ahí que la pregunta de investigación a responder es: ¿cuál será la expresión del receptor de prolactina en las distintas poblaciones de linfocitos T de ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico?

HIPÓTESIS

El receptor de prolactina se expresará en los linfocitos CD8, CD4, Treg y esta expresión será mayor en las células de ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus.

OBJETIVO

Determinar la expresión del receptor de prolactina en distintas poblaciones de linfocitos T obtenidos de bazo de ratón MRL/lpr que desarrolla una enfermedad similar a lupus eritematoso sistémico.

Objetivos particulares

1. Comparar las distintas poblaciones de linfocitos T de ratón, antes y después de desarrollar la enfermedad.
2. Determinar la expresión del receptor de prolactina en linfocitos T de ratón, antes y después de desarrollar la enfermedad.
3. Comparar las citocinas producidas por los linfocitos T, antes y después de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Tipo de estudio

Estudio observacional, prolectivo, longitudinal y comparativo.

Universo de estudio

Se emplearon ratones hembras de las cepas C57BL/6 (cepa control) de 9 semanas de edad y MRL/lpr (cepas que desarrollan lupus), de 9 semanas de edad (los cuales no presentan las manifestaciones de la enfermedad) y 18 semanas (con manifestaciones de la enfermedad). Se reprodujeron y mantuvieron en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" en condiciones libres de patógenos. Para realizar los experimentos los ratones se transportaron en compartimentos cerrados y especiales para el transporte de roedores, hechos de plástico resistente con pequeñas ventilaciones cubiertas con micro-aisladores con las características según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 al Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde se mantuvieron de uno a dos días antes de sacrificarlos por eutanasia.

Se utilizaron 3 grupos:

- Grupo 1. Ratones C57BL/6 de 9 semanas de edad, como grupo control.
- Grupo 2. Ratones MRL/lpr de 9 semanas de edad, Grupo de ratones que aún no desarrollan síntomas de una enfermedad similar a lupus.
- Grupo 3. Ratones MRL/lpr de 18 semanas de edad. Grupo de ratones que presentan una enfermedad similar a lupus.

Variables

Independiente: Enfermedad similar a LES.

Dependiente: Expresión del receptor de prolactina.

TÉCNICAS

Determinación de proteinuria

Los niveles de proteínas en orina se determinaron antes de la eutanasia mediante el uso de tiras reactivas (URIDIAG 4000I300, MEX).

ELISA para anticuerpos IgG anti ds-DNA

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

Obtención de células de bazo

Los ratones fueron sacrificados por eutanasia (dislocación cervical) se obtuvo el bazo, se inyectó con solución salina isotónica estéril (SSIE) con ayuda de una jeringa de 5 mL y el tejido se disgregó sobre un colador de nylon de 70 μ m (BD Biosciences, USA) para obtener las células en un tubo de 50 mL. Se centrifugó la muestra a 1200 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de solución de lisis de glóbulos rojos DNA (Sigma Aldrich, USA) y se dejó actuar por 2 minutos, pasado este tiempo se aforó a 50 mL con SSIE para parar la lisis, se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células blancas en 10 mL de SSIE.

Se tomó una alícuota de la muestra, se hicieron diluciones y se contaron las células.

Tinción del receptor de prolactina

En una placa de 96 pozos se colocaron 1×10^6 células/pozo en 4 pozos y se tiñeron con un marcador de viabilidad VioGreen (Miltenyi Biotec, USA) Un pozo se tiñó con anti-PRL-R (clona T6, GeneTex, USA), anti-IgG biotinilado (Miltenyi Biotec, USA, clona X-57) y estreptavidina-APC (eBioscience, USA), el segundo se tiñó con un control de isotipo (IgG2a Invitrogen, USA), anti-IgG biotinilado y estreptavidina-APC. Posteriormente, ambos se tiñeron con anti-CD4-FITC (clona GK1.5), anti-CD3-APC-Vio770 (clona REA641), anti-CD8-PerCP (clona 53-6.7) de Miltenyi Biotec, USA y anti-B220-PE-Vio770 (clona RA3) de eBioscience, USA. El tercer pozo se tiñó con anti-PRL-R, anti-IgG biotinilado y estreptavidina-APC y el cuarto con control de isotipo (IgG2a), anti-IgG biotinilado y estreptavidina-APC, ambos se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC-Vio770, anti-CD25-PECy5 (clona PC61.5) de eBioscience, USA, se permeabilizó la membrana nuclear con un kit comercial (eBioscience, USA) y se tiñó con anti-FoxP3-PE (clona REA788) de Miltenyi Biotec, USA. Las muestras se leyeron en el citómetro MACSQuant Analyzer 10 y se analizaron con el programa FlowJo versión 10 (FlowJo LLC, USA).

Determinación de citocinas

Se colocaron 1×10^6 células/pozo en medio Tex Macs (libre de suero Miltenyi Biotec, USA) en 2 pozos de una placa de 96 pozos estéril; se les adicionaron 100 μ L de PMA/Ionomicina (eBioscience, USA), en una dilución 1:250 en medio Tex Macs, y se incubó la placa a 37 °C por 5 horas. Posteriormente las células se lavaron con FACS buffer, se tiñeron con un marcador de viabilidad VioGreen y con los anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC-Vio770, anti-CD8-PerCP y anti-B220-PE-Vio770. Se realizó una permeabilización intracelular con un kit comercial (BD Biosciences) y se tiñó 1 pozo con los anticuerpos anti-IFN γ -PE (clona XMG1.2) y anti-IL-17-APC (clona eBio17B7), el segundo se tiñó con anti-IFN γ -PE y anti-TNF α -APC (clona MPG-XT22) de eBioscience, USA.

Análisis estadístico.

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos [mediana (χ) y rango intercuartílico (RIQ)]. Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba normalidad Shapiro-Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupo se determinaron utilizando la prueba Kruskal-Wallis. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS versión 20.

RESULTADOS

Determinación de proteinuria y anticuerpos anti-dsDNA.

Para poder determinar si los ratones presentaban manifestaciones clínicas de la enfermedad, se midieron las concentraciones de proteínas en orina y de anticuerpos anti-dsDNA en suero. Los valores de proteína en orina se determinaron por medio de tiras reactivas, para los ratones C57BL/6 de 9 semanas (grupo control) fueron negativos al igual que los valores de anticuerpos anti-dsDNA (Ab anti-dsDNA) medidos por ELISA. Los ratones MRL/lpr de 9 semanas presentaron concentraciones tanto de proteínas en orina (χ : 15.00, RIQ: 11.25 mg/dL) como de Ab anti-dsDNA (χ : 1.11, RIQ: 16.87 ng/mL) mínimas, por lo que se toma como un grupo sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, aunque cuando se comparó con el grupo control, se observó una diferencia estadísticamente significativa. Los ratones MRL/lpr de 18 semanas tuvieron valores de proteinuria (χ : 200.00, RIQ: 270 mg/dL) y ab anti-dsDNA (χ : 407.68, RIQ: 424.11 ng/mL) elevados con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control y los ratones MRL/lpr de 9 semanas. Figura 6.

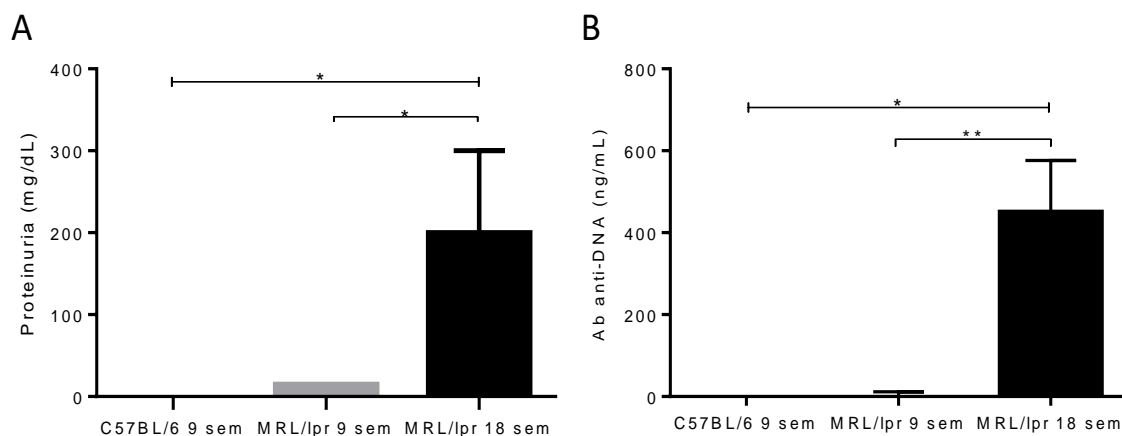


Figura 6. Determinación de proteinuria y anticuerpos anti-dsDNA. A) Proteinuria medida con tiras reactivas antes de la eutanasia. B) Concentración de anticuerpos anti-dsDNA medida por ELISA. Ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. * Kruskal-Wallis, **U de Mann-Whitney $p < 0.05$

Comparación de poblaciones de linfocitos

Como primer paso se clasificaron 3 poblaciones por sus marcadores de superficie B220 y CD3 (Figura 7A). Se graficó el número absoluto de células, el cual se calculó con los porcentajes de las poblaciones obtenidos con el programa Flowjo y el número de células totales en bazo. Al comparar los números absolutos de la población B220⁻CD3⁻ se observó un incremento con una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control (χ : 65.95×10^5 , RIQ: 92.65×10^5 células) con los grupos que desarrollan lupus, pero no existió una diferencia entre los ratones MRL/lpr de 9 semanas (χ : 17.94×10^6 , RIQ: 11.07×10^6 células) y los de 18 semanas (χ : 48.75×10^6 , RIQ: 59.20×10^6 células). En cuanto a la población B220⁺CD3⁺ existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos, siendo los ratones MRL/lpr de 18 semanas los que presentaron mayores números absolutos de éstas células (χ : 14.28×10^7 , RIQ: 13.71×10^7 células), seguidos de los MRL/lpr de 9 semanas (χ : 18.44×10^6 , RIQ: 88.60×10^5 células) y los C57BL/6, que presentaron menor número de células (χ : 77.00×10^4 , RIQ: 91.10×10^4 células). La última población B220⁻CD3⁺, que engloba a los linfocitos T, presentó un comportamiento semejante a la población anterior [C57BL/6 (χ : 30.97×10^6 , RIQ: 26.67×10^6 células), MRL/lpr 9 semanas (χ : 37.99×10^6 , RIQ: 17.35×10^6 células), MRL/lpr 18 semanas (χ : 97.89×10^6 , RIQ: 73.44×10^6 células)]. (Figura 7B).

Posteriormente se seleccionó la región B220⁻CD3⁺, para separar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ y se calculó el número absoluto de células (Figura 8A). Ninguna de las poblaciones tuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control C57BL/6 [CD4⁺ (χ : 18.46×10^6 , RIQ: 13.75×10^6 células), CD8⁺ (χ : 71.46×10^5 , RIQ: 94.79×10^5 células), CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (χ : 27.55×10^5 , RIQ: 21.52×10^5 células)] y los ratones MRL/lpr de 9 semanas [CD4⁺ (χ : 17.78×10^6 , RIQ: 44.75×10^5 células), CD8⁺ (χ : 12.42×10^6 , RIQ: 33.55×10^5 células), CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (χ : 56.70×10^5 , RIQ: 25.68×10^5 células)], pero se observó un incremento de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en los ratones MRL/lpr de 18 semanas [CD4⁺ (χ : 53.98×10^6 , RIQ: 59.16×10^6 células), CD8⁺ (χ : 37.47×10^6 , RIQ: $21.26 \times$

10⁶ células)], aunque la población CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no se vio afectada (χ : 33.04 x 10⁵, RIQ: 34.43 x 10⁵ células). (Figura 8B)

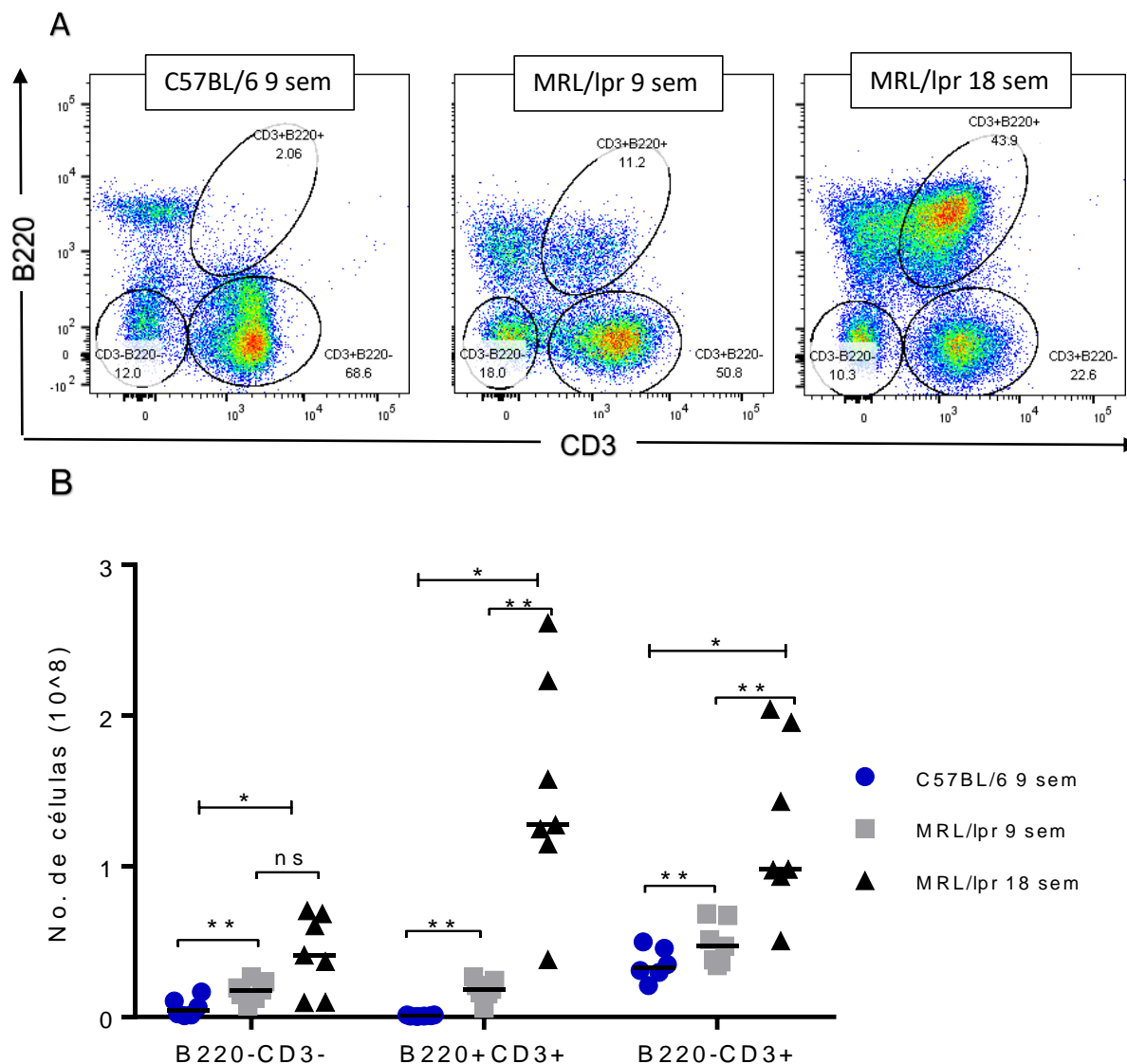


Figura 7. Comparación de poblaciones de linfocitos. Células teñidas con anticuerpos anti-B220 y anti-CD3 para separar los linfocitos B y T. A) Dot plot representativo de la separación de las poblaciones B220⁻CD3⁻, B220⁺CD3⁺ y la población B220⁻CD3⁺. B) Gráfica del número absoluto de células de las poblaciones, calculadas a partir del porcentaje y el número de células totales de bazo. Ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. ns = no significativo $p > 0.05$, * Kruskal-Walis, **U de Mann-Withney $p < 0.05$

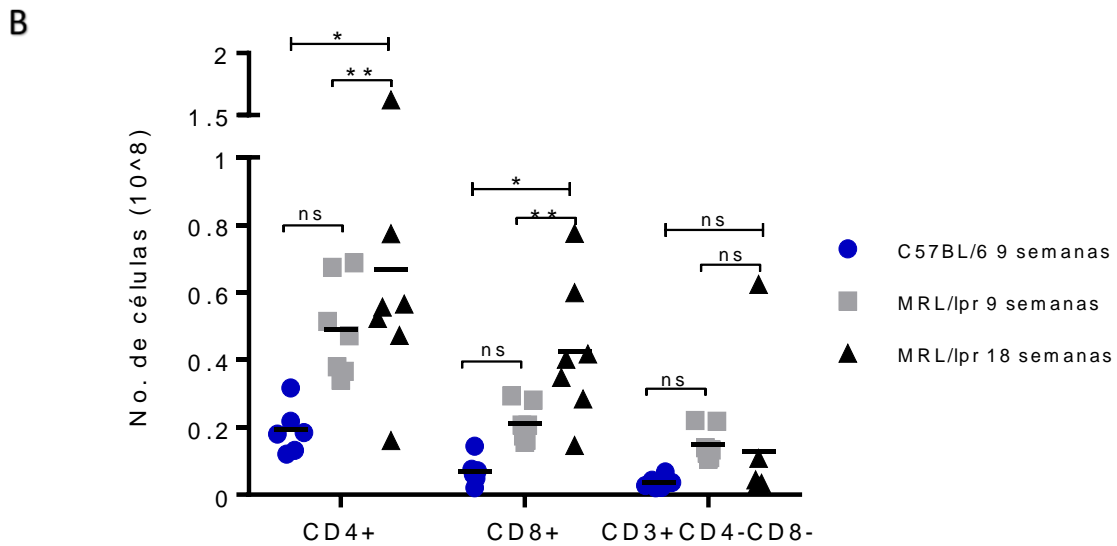
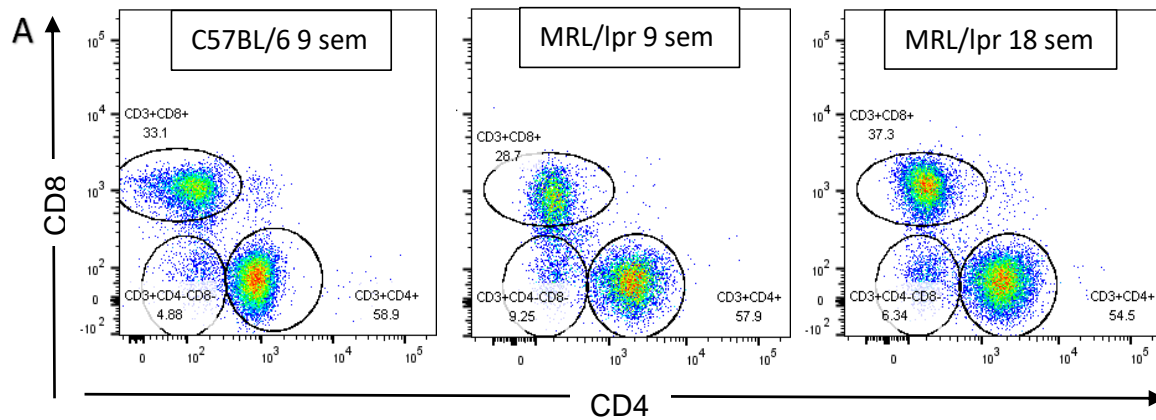


Figura 8. Comparación de poblaciones de linfocitos T. Células teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para separar los linfocitos T. A) Dot plot representativo de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻. B) Gráfica del número absoluto de células de las poblaciones, calculadas a partir del porcentaje y el número de células totales de bazo. Ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. ns = no significativo p>0.05, * Kruskal-Walis, **U de Mann-Withney p<0.05

Otra población que se comparó fue la población CD3⁺CD4⁺CD25⁺ FoxP3, es decir, los linfocitos T reguladores, la cual presenta un aumento estadísticamente significativo en los ratones sin manifestaciones clínicas, MRL/lpr 9 semanas (χ : 41.02 x 10⁵, RIQ: 10.53 x 10⁵ células) en comparación con el grupo control C57BL/6 9 semanas (χ : 17.66 x 10⁵, RIQ: 9.55 x 10⁵ células) y volvió a descender en los ratones con la enfermedad activa, MRL/lpr 18 semanas (χ : 14.10 x 10⁵, RIQ: 15.39 x 10⁵ células).

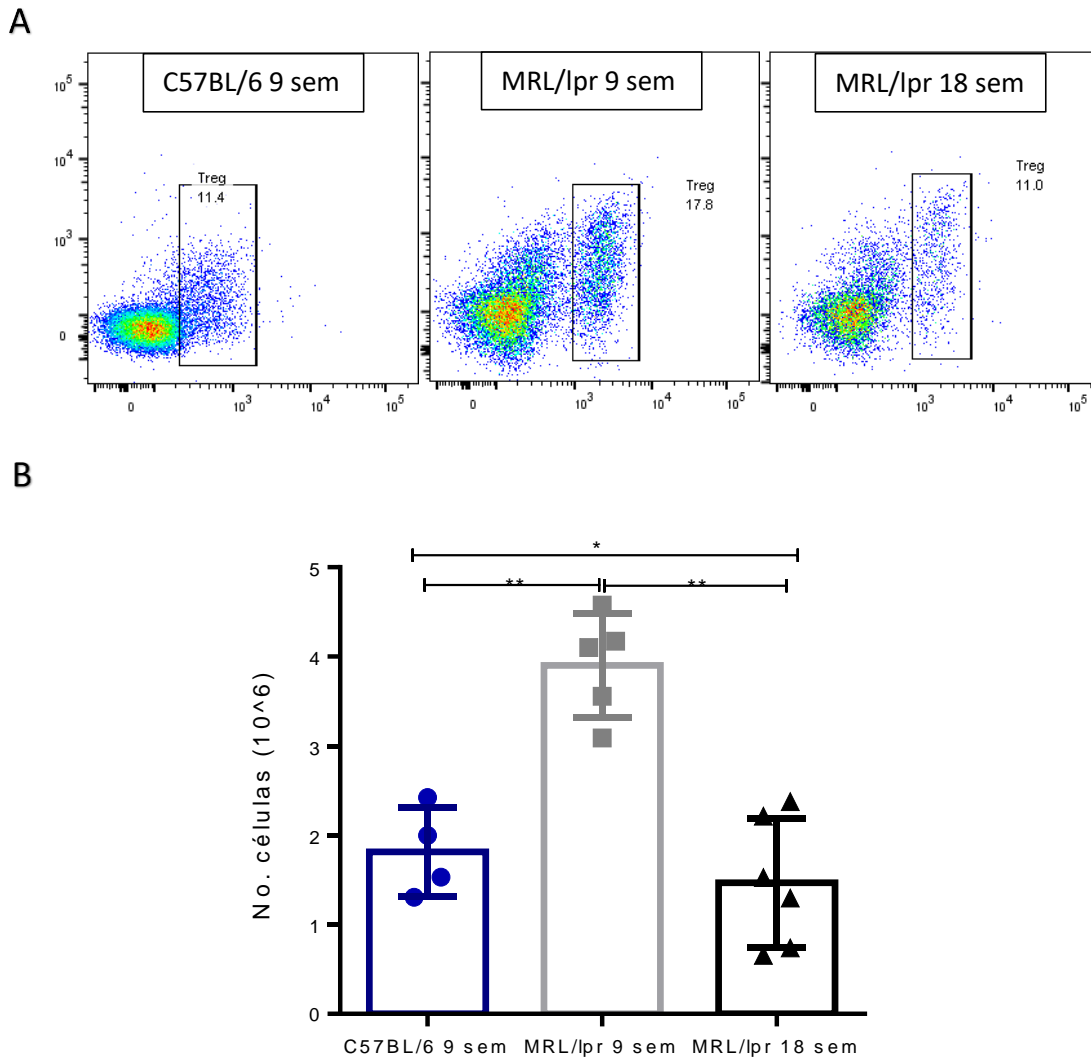


Figura 9. Comparación de la población CD3⁺CD4⁺CD25⁺/- FoxP3. Se tiñeron las células con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD3, anti CD25 y anti-FoxP3. A) se seleccionó la población CD3⁺CD4⁺, para determinar la población de linfocitos T reguladores con base en su expresión de CD25 y el factor de transcripción FoxP3. B) Gráfica del número absoluto de células de las poblaciones, calculadas a partir del porcentaje y el número de células totales de bazo. Ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. ns = no significativo $p > 0.05$, * Kruskal-Walis, **U de Mann-Whitney $p < 0.05$

Se determinó la producción de tres citocinas inflamatorias, IFN γ , TNF α e IL-17. En la figura 10 se muestra el número absoluto de células productoras de IFN γ , TNF α e IL-17 en la población B220⁻CD3⁻, donde no se encontró una diferencia significativa entre los ratones MRL/lpr de 9 semanas y de 18 semanas en ninguna de estas citocinas, pero si una diferencia con respecto a los ratones C57BL/6. En la población B220⁺CD3⁺ se observó un comportamiento similar al de la población B220⁻CD3⁻ en la citocinas IFN γ , TNF α y solamente en la IL17 hubo un incremento

estadísticamente significativo en el número de células productoras de IL-17 en los ratones MRL/lpr de 18 semanas con respecto a los de 9 semanas. (Cuadro 1)

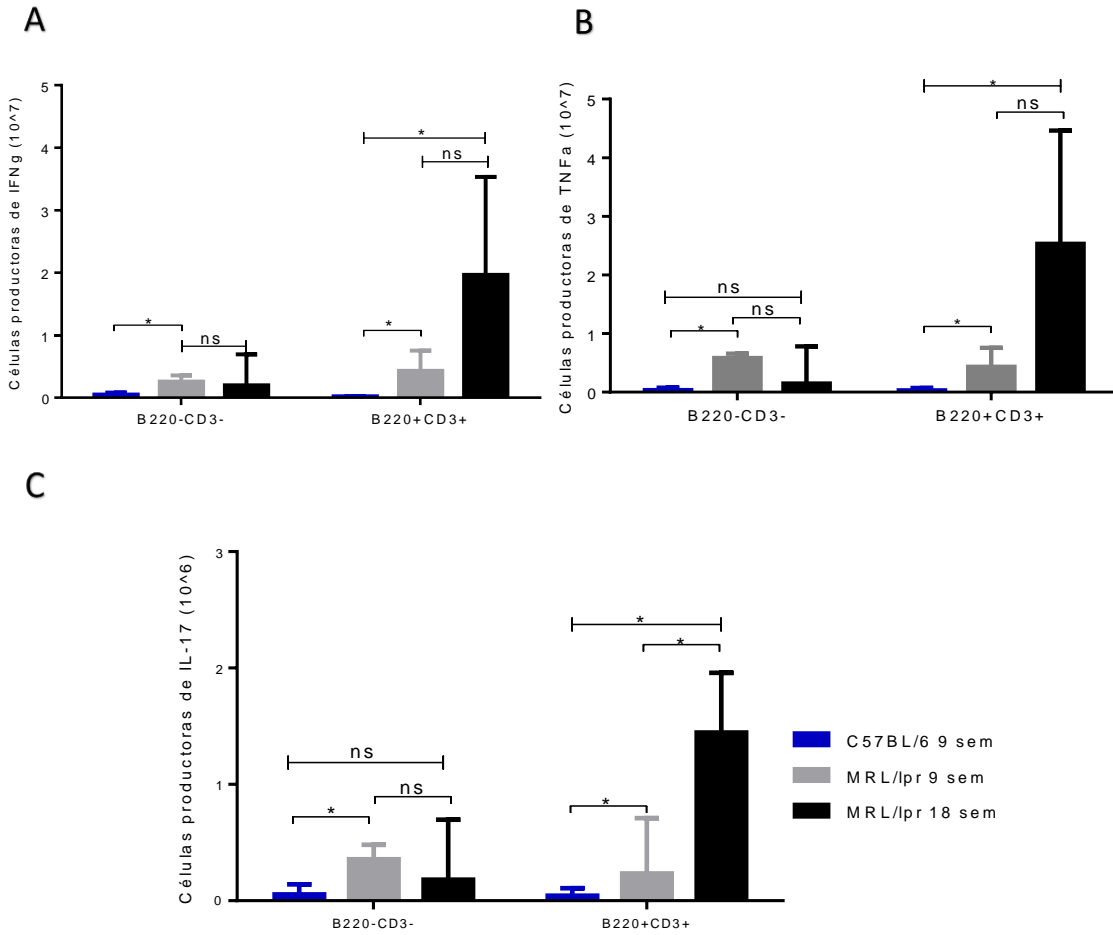


Figura 10. Linfocitos B220-CD3- y B220+CD3+ productores de IFN γ , TNF α e IL-17. Se analizó por citometría de flujo el porcentaje de expresión de las citocinas en las poblaciones B220-CD3- y B220+CD3+ y se calculó con el número de células productoras de éstas en ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. A) Células productoras de IFN γ , B) células productoras de TNF α y C) células productoras de IL-17. ns = no significativo p>0.05, * U de Mann-Whitney p<0.05

Cuadro 1. Número de células productoras de citocinas B220⁻CD3⁻ y B220⁺CD3⁺.

Células productoras	C57BL/6	MRL/lpr 9 semanas	MRL/lpr 18 semanas
IFN γ de la población B220 ⁻ CD3 ⁻	χ : 51.70 x 10 ⁴ , RIQ: 60.45 x 10 ⁴	χ : 25.70 x 10 ⁵ , RIQ: 13.23 x 10 ⁵	χ : 10.82 x 10 ⁵ , RIQ: 65.39 x 10 ⁵
IFN γ de la población B220 ⁺ CD3 ⁺	χ : 22.07 x 10 ⁴ , RIQ: 9.2 x 10 ⁴	χ : 43.20 x 10 ⁵ , RIQ: 33.14 x 10 ⁵	χ : 16.14 x 10 ⁶ , RIQ: 25.24 x 10 ⁶
TNF α de la población B220 ⁻ CD3 ⁻	χ : 35.41 x 10 ⁴ , RIQ: 63.87 x 10 ⁴	χ : 58.29 x 10 ⁵ , RIQ: 22.82 x 10 ⁵	χ : 10.99 x 10 ⁵ , RIQ: 73.66 x 10 ⁵
TNF α de la población B220 ⁺ CD3 ⁺	χ : 32.12 x 10 ⁴ , RIQ: 49.50 x 10 ⁴	χ : 43.20 x 10 ⁵ , RIQ: 33.14 x 10 ⁵	χ : 15.61 x 10 ⁶ , RIQ: 32.28 x 10 ⁶
IL-17 de la población B220 ⁻ CD3 ⁻	χ : 5.53 x 10 ⁴ , RIQ: 9.04 x 10 ⁴	χ : 3.57 x 10 ⁵ , RIQ: 2.89 x 10 ⁵	χ : 6.59 x 10 ⁴ , RIQ: 6.77 x 10 ⁵
IL-17 de la población B220 ⁺ CD3 ⁺	χ : 4.44 x 10 ⁴ , RIQ: 7.97 x 10 ⁴	χ : 2.15 x 10 ⁵ , RIQ: 1.58 x 10 ⁵	χ : 8.39 x 10 ⁵ , RIQ: 1.73 x 10 ⁵

En la población de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ aumenta el número de células productoras de IFN γ en los ratones MRL/lpr de 9 semanas, con respecto al grupo control, y a las 18 semanas donde el número decae (Figura 11A). Las células productoras de TNF α tienen un comportamiento similar, a excepción de los linfocitos CD4⁺, donde no hay un cambio significativo entre el grupo control y los ratones MRL/lpr de 9 semanas, observándose una disminución drástica a las 18 semanas (Figura 11B). La producción de IL-17 sigue el mismo patrón, el número de células productoras baja en los linfocitos CD4⁺ conforme progresa la enfermedad y los linfocitos CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ aumenta en los ratones MRL/lpr a las 9 semanas y baja a las 18 semanas (Figura 11C). (Cuadro 2)

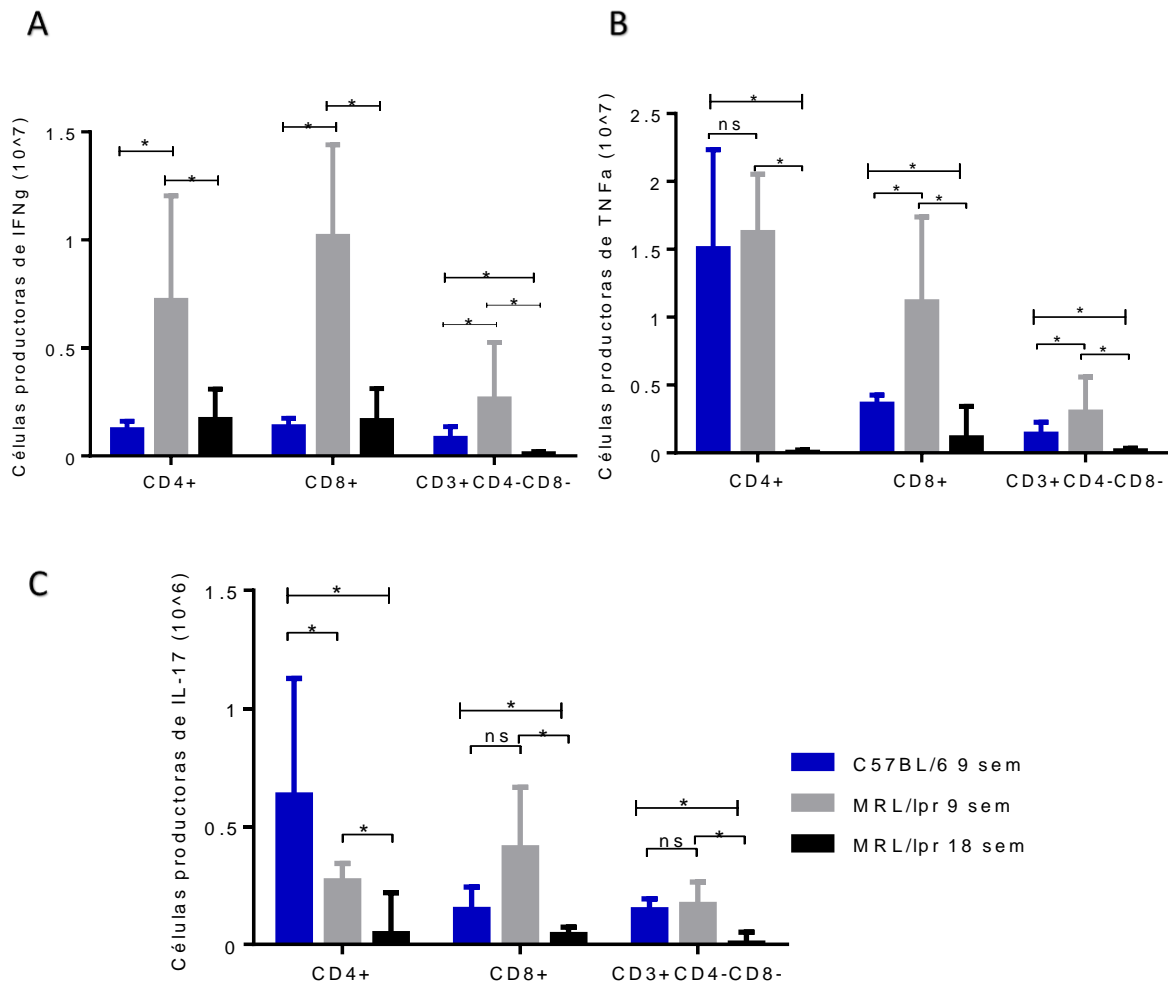


Figura 11. Linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ productores de IFN γ , TNF α e IL-17. Se analizó por citometría de flujo el porcentaje de expresión de las citocinas en las poblaciones CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ y se calculó con el número de células productoras de éstas en ratones C57BL/6 y MRL/lpr de 9 semanas de edad y MRL/lpr de 18 semanas de edad. A) Células productoras de IFN γ , B) células productoras de TNF α y C) células productoras de IL-17. ns = no significativo $p > 0.05$, * Kruskal-Wallis ** U de Mann-Whitney $p < 0.05$

Cuadro 2. Número de células productoras de citocinas en las poblaciones CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻.

Células productoras	C57BL/6 9 semanas	MRL/lpr 9 semanas	MRL/lpr 18 semanas
IFN γ de la población CD4 ⁺	χ : 12.13 x 10 ⁵ , RIQ: 4.59 x 10 ⁵	χ : 49.67 x 10 ⁵ , RIQ: 84.24 x 10 ⁵	χ : 8.75 x 10 ⁵ , RIQ: 10.47 x 10 ⁵
IFN γ de la población CD8 ⁺	χ : 15.57 x 10 ⁵ , RIQ: 7.67 x 10 ⁵	χ : 97.21 x 10 ⁵ , RIQ: 8.19 x 10 ⁵	χ : 7.36 x 10 ⁵ , RIQ: 16.00 x 10 ⁵
IFN γ de la población CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	χ : 7.93 x 10 ⁵ , RIQ: 9.90 x 10 ⁵	χ : 18.31 x 10 ⁵ , RIQ: 27.21 x 10 ⁵	χ : 5.47 x 10 ⁴ , RIQ: 9.71 x 10 ⁴
TNF α de la población CD4 ⁺	χ : 15.05 x 10 ⁶ , RIQ: 12.10 x 10 ⁶	χ : 16.23 x 10 ⁶ , RIQ: 8.82 x 10 ⁶	χ : 1.01 x 10 ⁶ , RIQ: 4.95 x 10 ⁶
TNF α de la población CD8 ⁺	χ : 35.87 x 10 ⁵ , RIQ: 18.45 x 10 ⁵	χ : 11.12 x 10 ⁶ , RIQ: 10.12 x 10 ⁶	χ : 8.47 x 10 ⁵ , RIQ: 14.42 x 10 ⁵
TNF α de la población CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	χ : 13.77 x 10 ⁵ , RIQ: 9.86 x 10 ⁵	χ : 30.05 x 10 ⁵ , RIQ: 27.29 x 10 ⁵	χ : 1.25 x 10 ⁵ , RIQ: 1.94 x 10 ⁵
IL-17 de la población CD4 ⁺	χ : 63.32 x 10 ⁴ , RIQ: 77.14 x 10 ⁴	χ : 23.58 x 10 ⁴ , RIQ: 12.49 x 10 ⁴	χ : 1.22 x 10 ⁴ , RIQ: 21.25 x 10 ⁴
IL-17 de la población CD8 ⁺	χ : 14.83 x 10 ⁴ , RIQ: 16.96 x 10 ⁴	χ : 25.99 x 10 ⁴ , RIQ: 51.68 x 10 ⁴	χ : 1.5 x 10 ⁴ , RIQ: 6.40 x 10 ⁴
IL-17 de la población CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	χ : 14.74 x 10 ⁴ , RIQ: 11.12 x 10 ⁴	χ : 12.78 x 10 ⁴ , RIQ: 12.43 x 10 ⁴	χ : 2.63 x 10 ³ , RIQ: 35.89 x 10 ³

Expresión del receptor de prolactina en diferentes poblaciones de linfocitos

Una vez separadas las poblaciones de linfocitos, se hizo el análisis de la expresión del receptor de prolactina en cada una. Se graficó la intensidad media de fluorescencia (IMF). El grupo control tuvo IMF bajas, lo que puede ser considerado como un estado basal (Cuadro 3), en la mayoría de los casos, no hubo diferencias significativas con el grupo de ratones MRL/lpr de 9 semanas (Figura 12A, B), a

excepción de los linfocitos CD8⁺ que aumentaron la expresión del receptor (Figura 12B). En los ratones MRL/lpr de 18 semanas el PRLR incrementó en todas las poblaciones. No se incluyeron los datos de la población B220⁺CD3⁺ debido a que era demasiado pequeña como para que el sistema pudiera registrar correctamente la IMF.

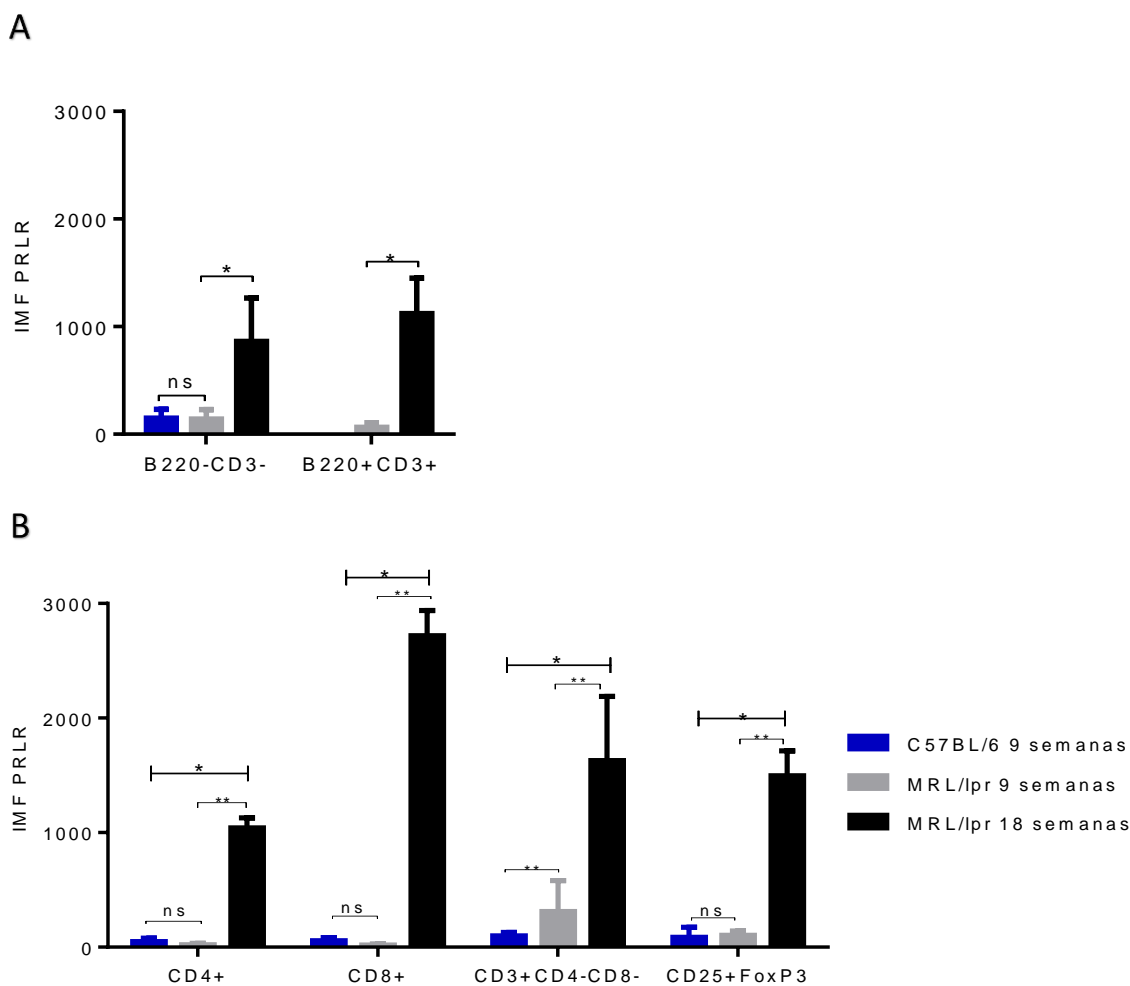


Figura 12. Expresión del receptor de prolactina en las poblaciones de linfocitos analizadas. Se midió por citometría de flujo la IMF del receptor de prolactina en los linfocitos de los ratones C57BL/6 de 9 semanas, MRL/lpr de 9 semanas y MRL/lpr de 18 semanas. A) Poblaciones B220⁻CD3⁻, B220⁺CD3⁺. B) Linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻. ns = no significativo p>0.05, * U de Mann-Whitney p<0.05

Cuadro 3. Intensidades medias de fluorescencia en las poblaciones de linfocitos en los ratones C57BL/6 de 9 semanas, MRL/lpr de 9 semanas y MRL/lpr de 18 semanas. (NR = no reportado)

Población	C57BL/6 9 semanas	MRL/lpr 9 semanas	MRL/lpr 18 semanas
B220 ⁻ CD3 ⁻	χ : 133.75 RIQ: 155.65	χ : 170.00 RIQ: 153	χ : 739.00 RIQ: 664.15
B220 ⁺ CD3 ⁺	NR	χ : 85.00 RIQ: 66.00	χ : 1129.00 RIQ: 1345.00
CD4 ⁺	χ : 51.30 RIQ: 55.80	χ : 22.50 RIQ: 20.35	χ : 1088.00 RIQ: 1016.95
CD8 ⁺	χ : 55.30 RIQ: 50.10	χ : 22.10 RIQ: 15.70	χ : 2841.00 RIQ: 2656.50
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	χ : 98.35 RIQ: 57.08	χ : 328.90 RIQ: 517.73	χ : 1671.00 RIQ: 1609.00
Treg	χ : 68.50 RIQ: 161.75	χ : 104.50 RIQ: 76.25	χ : 1420.00 RIQ: 1345.50

DISCUSIÓN

Aunque la patogénesis de LES sigue sin conocerse, está claro que participan diversos factores, entre ellos alteraciones en la activación de las células B, disfunción de la célula T, alteraciones en la apoptosis y un desequilibrio en el balance de las citocinas.³⁶

La relación entre los niveles de prolactina y la sintomatología de LES ha sido estudiada, así como su efecto en los linfocitos B y T, pero esto no se ha relacionado con la expresión de su receptor en las células. Investigaciones previas han demostrado que la expresión del receptor en linfocitos B, es mayor en ratones MRL y MRL/lpr en comparación con ratones C57BL/6 ambos de 9 semanas de edad, además de reportar una expresión del receptor diferente entre las distintas subpoblaciones de linfocitos B³⁰. A diferencia del comportamiento de la expresión del receptor en los linfocitos B, en las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD4⁻CD8⁻) que estudiamos no existe una diferencia significativa entre los ratones C57BL/6 con los ratones MRL/lpr de 9 semanas y no encontramos una diferencia en la expresión del receptor entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Sin embargo, la expresión del receptor incrementó en los linfocitos T de los ratones MRL/lpr de 18 semanas, en los cuales la enfermedad se encuentra activa, al igual que lo ha reportado en los linfocitos B donde la expresión aumenta en los ratones MRL y MRL/lpr a las 25 semanas de edad y durante estados de hiperprolactinemia, donde se exacerban las manifestaciones de la enfermedad.³¹ En pacientes con LES se ha reportado una deficiencia tanto en el número de linfocitos Treg^{37,38}, así como en su función^{39,40}. Se encontró que los linfocitos Treg en ratones MRL/lpr de 9 semanas existe un aumento estadísticamente significativo en comparación con los C57BL/6 de la misma edad, pero en los ratones MRL/lpr de 18 semanas esta población disminuye. Un resultado similar al reportado en 2008 por Yang C. y colaboradores, donde existe un incremento temprano, pero esta población decae con la edad.⁴¹ En pacientes con LES activo se reporta un incremento en la expresión del receptor en los linfocitos Treg y T efectoras.³⁹ Por lo que la expresión del receptor en los linfocitos incrementa con las manifestaciones de la enfermedad, cuando las células se encuentran activas, como es en el caso de los ratones de 18 semanas o pacientes con LES activo, por esto, la expresión del

receptor podría ser utilizada como un marcador de activación de la enfermedad. Aunque no existió una diferencia en la expresión del receptor entre los ratones control y los que desarrollan LES a las 9 semanas, sería importante determinar la interacción de la PRL con su receptor de PRL en las poblaciones estudiadas, ya que puede tener una función diferente entre los ratones C57BL6 y los MRL/lpr, como es en el caso linfocitos B inmaduros donde la PRL es capaz de disminuir la expresión de genes proapoptóticos y aumentar la expresión de genes antiapoptóticos solamente en los ratones MRL/lpr.⁴²

Al comparar el número absoluto de las diferentes poblaciones estudiadas entre los ratones control y los que desarrollan LES con o sin las manifestaciones clínicas de la enfermedad, encontramos diferencia en algunas poblaciones. Los resultados mostraron que la población B220⁻CD3⁻, se encuentra aumentada en los ratones que desarrollan lupus con respecto a los ratones sanos, pero no muestra un aumento significativo en el número de células en ratones con manifestaciones de la enfermedad a pesar de que la expresión del receptor se encuentre incrementada. Dentro de estas poblaciones podemos encontrar diversos linajes, como el de células linfoides innatas (ILC) y las células Natural Killer (NK), que son usualmente identificadas por la ausencia de marcadores específicos para células T y células B y que se han reportado que aumentan en paciente con LES y pueden producir IL-17.^{43, 44} Los resultados obtenidos confirman lo reportado en pacientes, que esta población produce una mayor cantidad de IL17, IFN γ y TNF en los ratones que desarrollan LES en comparación a los controles.

Otra población estudiada fue la B220⁺CD3⁺, la cual se ha encontrado en pacientes y modelos de LES, esta población se encuentra presente en los ratones MRL/lpr sin manifestaciones de la enfermedad y aumenta aproximadamente 8 veces más en los ratones MRL/lpr con las manifestaciones de la enfermedad (18 semanas). En la literatura se han descrito poblaciones B220 positivas que expresan marcadores de linfocitos T. Una de ellas es descrita como linfocitos T doble negativos B220⁺ (CD4⁻CD8⁻B220⁺) que son detectables en ratones lpr desde el primer mes de edad y representan del 75 al 90% de las células a las 16 a 20 semanas de edad.⁴⁵ Otra subpoblación son los linfocitos T B220⁺ que expresan niveles decrecientes de CD4, estos son encontrados en órganos linfoides y probablemente derivan de un

precursor de células CD4⁺. Cuando se estimulan estas células *in vitro*, no hay proliferación ni producción de IL-2⁴⁶, por lo que no se han relacionado con las patogénesis en autoinmunidad. Sin embargo, en los ratones MRL/lpr esta población producen IFN γ , TNF α , además el número de células que producen IL-17 incrementa con diferencia estadísticamente significativa con las manifestaciones de la enfermedad, lo que podría contribuir a la inflamación y daño en los tejidos.

Las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ no muestran un aumento significativo en el número de células o en la expresión del receptor de PRL en ratones MRL/lpr de 9 semanas con respecto a los C57BL/6, pero la producción de IFN γ es mayor. Esta citocina se ha relacionado con la patogénesis de LES, ya que se han reportado niveles altos en el suero de pacientes con la enfermedad activa, y en los ratones a los cuales se le eliminó el gen para IFN γ se observó una disminución de la glomerulonefritis.⁴⁷ Contrariamente en los ratones de 18 semanas, donde se esperaría aún más células productoras de IFN γ , se encontró una disminución del 80 al 85%. En 1986 George C. Tsokos y colaboradores reportaron un comportamiento similar cuando estimularon *in vitro* células mononucleares periféricas provenientes de personas sanas y de pacientes con lupus, encontrando que las células de los pacientes con lupus activo producen cantidades menores de la citocina.⁴⁸ Este comportamiento puede deberse a que las células no son funcionales. El mismo comportamiento se observó en las células productoras de TNF α en los linfocitos CD8⁺, donde en los ratones MRL/lpr de 9 semanas existe un aumento de células productoras y a las 18 semanas este número disminuye, pero en los linfocitos CD4⁺ solo se observa disminución y no un aumento. Existen reportes donde se menciona que existe un aumento en las concentraciones de TNF en suero y otros donde no existe una diferencia en comparación con los controles, en su lugar, los niveles del receptor soluble de TNF (TNF-sR) se correlacionan positivamente con el grado de actividad de la enfermedad.⁴⁹ Por lo que podría ser importante determinar si en los ratones también incrementa el receptor soluble de TNF con la enfermedad.

La población que separamos como CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no muestra un aumento estadísticamente significativo, aunque haya un aumento en su expresión del receptor de prolactina. Al igual que en las poblaciones anteriores, la producción de IFN γ y TNF α muestra un aumento significativo en los ratones MRL/lpr de 9 semanas

en comparación con los C57BL/6, pero desciende en los ratones MRL/lpr de 18 semanas. En la producción de IL-17 no existe un aumento significativo, pero si una disminución. Esta población puede contener células conocidas como linfocitos doble negativos, la cual se ha encontrado en individuos sanos y pacientes con lupus, aunque no se conoce su origen. Existe evidencia de que derivan parcialmente del timo y parcialmente de los linfocitos CD8⁺ activados que pierden la expresión de sus moléculas CD8 de superficie.⁵⁰ También puede contener células T “Natural Killer” (NKT), las cuales comparten propiedades funcionales y fenotípicas con las células “Natural Killer” y los linfocitos T. Estas células pueden ser de tipo I, las cuales producen IFN γ , TNF α e IL-4, o tipo II, éstas pueden producir IFN γ , TNF α e IL-17A e IL-6.⁵¹ Se necesitaría hacer un *FACS sorting* para separar las distintas poblaciones y poder diferenciarlas por otros marcadores específicos, además de cuantificar más citocinas proinflamatorias, así como antiinflamatorias.

CONCLUSIONES

- Todas las poblaciones estudiadas, CD8⁺, CD4⁺, CD3⁺CD4⁻CD8⁻, B220⁺CD3⁺ y B220⁻CD3⁻, expresan constitutivamente el receptor de prolactina y esta expresión aumenta cuando la enfermedad está activa.
- Las poblaciones B220⁺CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ incrementan en los ratones MRL/lpr de 18 semanas.
- La población CD8⁺ es la que expresa mayor cantidad del receptor de prolactina en ratones MRL/lpr de 18 semanas.
- En ratones MRL/lpr el número de células productoras de IFN γ aumenta a las 9 semanas en las poblaciones CD8⁺, CD4⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻ y disminuyen en ratones de 18 semanas. Esto mismo sucede con las células productoras de TNF α e IL-17 en las poblaciones CD8⁺ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻.
- En la población CD4⁺ el número de células productoras de TNF α e IL-17 disminuye en ratones MRL/lpr de 9 y 18 semanas en comparación con ratones C57BL/6.
- El número de linfocitos Treg incrementa en ratones MRL/lpr en comparación con ratones C57BL/6, ambos de 9 semanas de edad, y disminuye en ratones MRL/lpr de 18 semanas.
- La población de linfocitos aberrantes B220⁺CD3⁺ aumenta en número celular en ratones MRL/lpr de 18 semanas y produce IL-17.

PERSPECTIVAS

Habiendo confirmado que los linfocitos T expresan el receptor de prolactina, se podría investigar el efecto de la prolactina en estas poblaciones y su producción de citocinas. Además de caracterizar a las subpoblaciones que engloban los linfocitos B220⁻CD3⁻ y CD3⁺CD4⁻CD8⁻.

REFERENCIAS

1. Pavón L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y translacional. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.
2. Rojas O. Inmunología. 3a ed. México: Editorial Médica panamericana; 2006.
3. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt IM. Inmunología [Internet]. 8a ed. España: Elsevier; 2014. Disponible en: <https://www-dawsonera-com.pbidi.unam.mx:2443/readonline/9788490223994>
4. Ivanov I, McKenzie B, Zhou L, Tadokoro C, Lapelley A, Lafaille J, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell*. 2006; 126: 1121-1133.
5. Miossec P, Korn T, Kuchroo V. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N Engl J Med*. 2009; 361: 888-98.
6. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby. 6a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
7. Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, Nocentini G, Ronchetti S, Caterbi S, Valentini V, Riccardi C, Gerli R. Balance Between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 823085
8. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and Autoimmunity: Production of CD25⁺CD4⁺ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J Immunol*. 1999; 162: 5317-5326.
9. López M. Fase de activación/efectora de la respuesta inmune. Trasplante al día. Barcelona: Sociedad Española de Nefrología/Plusmedical; 2013.
10. Sun B. T Helper Cell Differentiation and Their Function [Internet]. New York: Springer; 2014.
11. Lahita R, Tsokos G, Buyon J, Koike T. Systemic Lupus Erythematosus [Internet]. 5a ed. New York: Elsevier; 2011. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:8080/science/book/9780123749949>
12. Abbas A, Lichtman A, Pallei S. Inmunología celular y molecular. 8ª ed. México: Elsevier; 2015.
13. Crampton S, Morawski P, Bolland S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Dis Model Mech*. 2014; 7(9): 1033-1046.
14. Devarajan P, Chen Z. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good. *Immunol Res*. 2013; 57 (0): 12-22.
15. Boodhoo K, Liu S, Zuo X. Impact of sex disparities on the clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Medicine*. 2016 95: 29.
16. Schur PH, Massarotti EM. Lupus Erythematosus: Clinical Evaluation and Treatment [Internet]. Boston: Springer; 2012.

17. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *The American Journal of Pathology*. 1985; 121(3): 531-551.
18. Rubtsova K, Marrack P, Rubtsov A. Sexual dimorphism in autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015; 125(6): 2187–2193.
19. Diakonova M. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Recent Advances in Prolactin Research*. Switzerland: Springer; 2015.
20. Blanco F, Legorreta M, Huerta Y, Chávez K, Montoya E, Chávez L, et al. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*. 2012; 69(5): 329-336.
21. Nira J, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary Prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*. 1996; 17(6): 639-669.
22. Bole C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal, Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev*. 1998; 19(3): 225-268.
23. Brooks C. Molecular Mechanisms of Prolactin and Its receptor. *Endocr Rev*. 2012; 33(4): 504-525.
24. Bernard, V. et al. New insights in prolactin: pathological implications. *Nat. Rev. Endocrinol*. 2015
25. Freeman M, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function and Regulation of secretion. *Physiological Reviews*. 2000; 80(4): 1524-1585.
26. Chilton B, Hewetson A. Prolactin and Growth Hormone Signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 68: 1-22.
27. Binart, N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrin Met*, 2010 21(6): 362-368.
28. De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. Prolactin and Autoimmunity. *Pituitary*. 2005; 8: 25-30.
29. Jara L, Medina G, Saavedra M, Vera O, Torres H, Navarro C, et al. Prolactin has a pathogenic role in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res*. 2017; 65(2): 512-523.
30. Ledesma Y, Blanco F, Fuentes E, Tesoro E, Hernández R, Arriaga L, et al. Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional T-1 B cells after prolactin treatment. *BMC Immunol*. 2012; 13:11.
31. De Mello V, Savino W, Postel MC, Dardenne M. Role of prolactin and Growth Hormone on Thymus Physiology. *Dev Immunol*. 1998; 6: 317-323
32. Chavez K, Hernández J, Zenteno E, 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. *Clinical Immunology* 2005; 116:182-191.
33. Takizawa K, Kitani S, Takeuchi F, et al. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J* 2005; 52:635-641.

34. Tomio A, Schust DJ, Kawana K, et al. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunol Cell Biol* 2008; 86:616-621.
35. Legorreta M, Chávez K, Montoya E, et al. Prolactin downregulates CD4+CD25hiCD127low/- regulatory T cell function in humans. *J Mol Endocrinol* 2012; 48:77-85.
36. Gómez JA, Cervera R. Lupus eritematoso sistémico. *Medicina & Laboratorio*. 2008; 14 (5-6): 211-223.
37. Alvarado B, Hernandez B, Portales D, Baranda, L, Layseca E, Abud C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 2006. 27: 110–118.
38. Makoto M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, et al. Regulatory T Cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2005; 175: 8392-8400.
39. Legorreta M, Chávez K, Chávez L, Cervera H, Zenteno E, Barile L, et al. Funcion of Treg cells decreased in patients with systemic lupus erithematosus due to the effect of prolactin. *Medicine.* 2016; 95(5): 1-9.
40. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky P. Deficient CD4+CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active syatemic Lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007; 178: 2579-2588.
41. Cui Y, Tian L, Guang L, Trendell N, Ma L, Chi L, et al. Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a sistemic autoimmune disorder: roles of IL-2 versus IL-15. *Eur. J Immunol.* 2008; 38: 1664-1676.
42. Flores R, Blanco F, Fuentes E, Chávez L, Gorocica P, Pizaña A, et al. Prolactin rescues immature B-cells from apoptosis induced by B-cell receptor cros-linking. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 1-11.
43. Shikhagai M, Germar K, Bal S, Romero X, Spits H. Innate lymphoid cells in autoimmunity: emerging regulators in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumato.* 2007; 13: 164-173.
44. Sutton C, Mielke L, Mills K. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42: 2221–2231.
45. Giese T, Davidson W. In CD8⁺ T Cell-Deficient lpr/lpr Mice, CD4⁺B220⁺ and CD4⁺B220⁻ Double-Negative T cells as the Predominant Population in Enlarged Lymph Nodes. *J Immunol.* 1995; 154: 4986-4995.
46. Asano T, Tomooka S, Serushago B, Himeno K, Nomoto K. A new T cell subset expressing B220 and CD4 in lpr mice: defects in te reponse to mitogens and in the production of IL-2. *Clin exp Immunol.* 1998; 74: 36-40.
47. Theopilopoulos A, Koundouris S, Kono D, Lawson B. The role of IFN- γ in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res.* 2001; 3: 136-141.
48. Tsokos G, Boumpas D, Smith P, Djeu J, Balow J, Rook A. Deficient γ -interferon production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 1986; 29(10): 1210-1215.

49. Lee H, Sugino H, Nishimoto N. Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 1-5.
50. Konya C, Paz Z, Tsokos G. The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26: 493-501.
51. Chia L, Zimmer M, Chyung W. The functions of type I and type II Natural Killer T (NKT) cells in inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19(6): 1330-1338.