

11261

S
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

F.M.

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA
CAMPUS UNAM-UAQ, JURIQUILLA, QRO.

"ANALISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE
PROLACTINAS EN INTERACCIONES
ENDOTELIO-LINFOCITOS".

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS *Bionálicas*
(NEUROBIOLOGIA)

P R E S E N T A :

PÁVEL MONTES DE OCA BALDERAS

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ LABORA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275545 1999



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.

PAGINACION

DISCONTINUA.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora. Durante el periodo en que se llevó a cabo este trabajo conté con el apoyo de una beca para estudios de Maestría otorgada por el CONACyT.

A la

Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** porque no sé si algún día le devolveré todo lo que me ha dado.

A Alejandra por su paciencia inagotable y por estos años en los que he aprendido tantas cosas que de otra manera difícilmente lo hubiera hecho.

A mis padres porque lo que soy ahora en gran parte es por ellos.

A mis hermanos Marco Antonio y Horacio quienes siempre han sido ejemplo para mí y con quienes incondicionalmente he contado.

A mis amigos de la vida Ricardo, Adrián, Fernando y Oquitzin.

A Carmen por su dirección, comentarios, por ser una jefa tan comprensible y por supuesto por dejarme trabajar en su laboratorio.

A Ed y Rogelio quienes con sus experiencia me han ayudado y enseñado mucho.

A mi jurado Dr. Alejandro, Dr. Mauricio, Dra. Tana y Dr. Rogelio por sus valiosos comentarios, críticas y sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio Ale, Toño, Marco, Daniel, Gabriel, Ana, Zulma, Carlos, Fernando, Salvador, Javier, Luz, Alejandra, Bibiana, Luis, Jorge, Carolina, Chino, Eileen y los que se me olviden.

A mis valedores del CNB que no menciono por no olvidar a alguno gracias a mi pésima memoria.

A todas las personas de quienes a lo largo de mi vida he aprendido un sinfín de cosas.

RESUMEN

El tráfico de leucocitos desde la circulación a los tejidos depende de su adhesión al endotelio de los vasos sanguíneos. Este proceso es regulado por múltiples citocinas producidas por diversos tipos celulares. Una de las citocinas que podrían regular este proceso es la PRL, ya que es producida por y tiene efectos sobre diversas células del sistema inmune, además de que el endotelio produce PRL capaz de modificar autócrinamente su funcionamiento. El propósito de este estudio fué el de analizar la posible participación de la PRL en la regulación de la adhesión de los leucocitos al endotelio. Para este fin células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) fueron marcadas con ^{51}Cr e incubadas con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) previamente tratadas con interleucina-1. La radioactividad de las células adheridas a las HUVEC permitió cuantificar la adhesión entre ambos tipos celulares. La incubación de las PBMC con diferentes concentraciones de PRL estimuló significativamente ($p < 0.05$) su adhesión a HUVEC. Un efecto similar se observó con el fragmento amino-terminal de 16 kDa de la PRL. Ambos efectos fueron comparables al obtenido con interleucina-2, molécula ya caracterizada como promotora de la adhesión de leucocitos a endotelio. Adicionalmente la incubación de las PBMC con tres anticuerpos monoclonales anti-PRL pero no con anticuerpos preinmunes, redujo significativamente ($p < 0.05$) su adhesión a HUVEC. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con una posible estimulación parácrina/autócrina de la PRL sobre la adhesión de leucocitos al endotelio vascular.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Tráfico de Leucocitos	2
La Prolactina y sus Receptores	6
La Prolactina y el Sistema Inmune	10
Efecto de Prolactina sobre el Endotelio Vascular	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivos Particulares	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Obtención de Células	
a.HUVEC	17
b.PBMC	18
Ensayo de Adhesión	
a.Tratamiento y Activación de las Células	18
b.Marcaje de las PBMC	19
c.Coincubación	19
d.Cuantificación	
e.Análisis Estadístico	
RESULTADOS	
Establecimiento del Ensayo de Adhesión	21
Efecto de Prolactina Humana	22
Efecto de IL-2 y Prolactina Humana 23kDa	23
Efecto de Anticuerpos Monoclonales anti-Prolactina	24
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	
Estandarización del Ensayo de Adhesión	25
Efecto Estimulador de Prolactina	27
PERSPECTIVAS	33
BIBLIOGRAFÍA	34

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo las células endoteliales (CE) fueron consideradas solamente como células pasivas encargadas de revestir los vasos sanguíneos y sin la capacidad de ser activadas por los componentes del plasma sanguíneo. Sin embargo, actualmente se sabe que dependiendo de las señales extracelulares a las que sean expuestas, estas células son capaces de experimentar cambios en la expresión de genes, lo que les permite participar activamente en diferentes procesos como la trombosis, la reacción inmune y el desarrollo de algunas enfermedades entre otros (Mantovani et al., 1992).

Desde hace varios años se sabe que los leucocitos y las CE pueden interactuar a través de un diálogo molecular mediado por polipéptidos llamados citocinas las cuales pueden ser producidas tanto por el endotelio como por los leucocitos y actúan tanto de manera autócrina como parácrina (Mantovani, 1992). Moléculas como la interleucina-1 (IL-1), el interferón gamma (INF- γ), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los factores estimuladores de colonias de granulocitos y de granulocitos macrófagos (G-CSF y GM-CSF) son producidas por y tienen efectos en ambos tipos celulares, mientras que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-4 (IL-4) son producidos por las células del sistema inmune (SI) y tienen diferentes efectos sobre las CE. Por su parte el endotelio produce y secreta interleucina-6, 8 (IL-6, IL-8), factores estimuladores de colonias de macrófagos (M-CSF), etc. que son capaces de activar diversos mecanismos en los diferentes tipos de leucocitos. Relacionado también con la interacción entre endotelio y leucocitos se conoce bien que las CE pueden funcionar como células presentadoras de antígeno (APC) y de esta manera activar a los linfocitos T (Hughes et al., 1990a). De igual manera se sabe de la capacidad de las CE para aumentar, mediante un mecanismo dependiente de contacto entre los dos tipos celulares, la producción por parte de los linfocitos T ayudadores (Th) de una de las interleucinas más importantes en el desarrollo de la respuesta inmune celular, la IL-2 (Swain, 1991; Guinan et al., 1989; Hughes et al., 1990b). La interacción entre las CE y los

leucocitos es crucial en la respuesta inmune, ya que de esta manera se regula el tráfico de las células inmunocompetentes del torrente sanguíneo a los diferentes tejidos (Roitt et al., 1996; Springer, 1994; Stoolman, 1989; Dustin y Springer, 1991).

TRÁFICO DE LEUCOCITOS

Las células del SI deben “vigilar” constantemente la presencia de patógenos infecciosos en el organismo para que en caso de encontrarse con un antígeno se promueva la acumulación de células leucocitarias en los sitios de daño o infección. Esta tarea de vigilancia se lleva a cabo de manera eficiente gracias a las propiedades de circulación y migración que los leucocitos poseen, lo que les permite moverse continuamente no sólo de los órganos linfáticos al torrente sanguíneo sino además al interior de los tejidos del organismo (Roitt et al., 1996).

Para que el movimiento de las células blancas del SI hacia los tejidos se lleve a cabo es necesaria la intervención de diferentes familias de moléculas que juegan papeles diferentes en este proceso. Actualmente existe un modelo llamado código de área (area code)(Fig. 1) que explica los diferentes patrones de migración de linfocitos monocitos y granulocitos a los diferentes tejidos, este modelo consta de tres etapas básicas. En la primera el leucocito que es arrastrado por el flujo sanguíneo se une al endotelio mediante selectinas y empieza a rodar por encima de él. Existen cuando menos tres tipos diferentes de selectinas: la selectina-P (presente en plaquetas y CE), la selectina-E (inducible en plaquetas y CE) y la selectina-L (expresada por todos los leucocitos circulantes). Estas moléculas comparten un dominio extracelular N-terminal tipo lectina dependiente de Ca^{++} , un número variable de dominios homólogos a los de las proteínas control del complemento y un dominio también extracelular relacionado al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los ligandos de estas moléculas son carbohidratos sialilados presentes en la membrana de diferentes células (Springer, 1994). Una vez que los leucocitos ya se han detenido y se encuentran fijos al endotelio entonces da inicio la segunda etapa en la que, además de la participación de las selectinas, los quimioattractores se encargan de promover la activación

de los leucocitos. Los quimioattractores juegan un papel trascendental en la regulación de diferentes genes, modulan la afinidad por su ligando de las moléculas de adhesión de los leucocitos, participan en la quimiotaxis (migración dependiente de la concentración de molécula) y en la haptotaxis (migración dependiente de la adhesividad del sustrato). Estos mensajeros se dividen en tres grupos principales: los quimioattractores clásicos (C5a, leucotrieno B4, etc.), las quimiocinas C-X-C (IL-8, ENA-78, etc.) y las quimiocinas C-C (MIP-1, MCP-1, RANTES, etc.). Estas moléculas pueden ser producidas por el endotelio, los leucocitos o por las células del tejido y llevan a cabo su efecto uniéndose a su receptor específico que activa la vía de la fosfolipasa C mediante proteínas G (Springer, 1994; Lloyd et al., 1996). En la etapa final la interacción de los leucocitos con las CE se fortalece y se inicia su migración hacia el tejido, durante esta etapa participan quimioattractores además de moléculas de adhesión que pueden ser de dos tipos principalmente: integrinas (Mac-1, LFA-1, etc.) o moléculas de adhesión pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1, etc.); a estas últimas pertenecen principalmente las moléculas de adhesión endotelial. Las integrinas son moléculas de adhesión formadas por dos subunidades unidas no covalentemente (α y β) que atraviesan la membrana celular y son probablemente las moléculas de adhesión más versátiles, ya que existen diferentes tipos de subunidades α y β que pueden combinarse. Estas moléculas se agrupan en tres categorías principales dependiendo de la subunidad β que posean y su función, aunque existen algunas excepciones. Las integrinas β_1 suelen estar relacionadas con la unión de las células a la matriz extracelular; las integrinas β_2 y β_3 intervienen en la adhesión célula a célula, particularmente las primeras median la adhesión de leucocitos a endotelio o a otras células inmunes, mientras que las segundas participan en las interacciones de plaquetas y neutrófilos en los sitios de inflamación o de daño vascular. Dado que la afinidad de las integrinas por su ligando es rápidamente regulada por la célula que las expresa, al parecer mediante cinasas y fosfatasa, se ha propuesto que las integrinas son las responsables directas del desplazamiento que llevan a cabo los leucocitos al migrar al espacio extravascular, esto a través de una regulación secuencial de su afinidad que produce sitios de mayor adhesividad en la membrana de la célula (Springer, 1994; Dustin y Springer, 1991; Shimizu et al., 1991; Van Seventer et al., 1990). Por su parte las moléculas de adhesión endotelial pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas son

expresadas basalmente o inducibles en el endotelio u otros tipos celulares por los diferentes mediadores de inflamación (TNF, IL-1, etc.). Los ligandos de estas proteínas son las integrinas y existen varios miembros de esta familia que pueden ser reconocidas por más de una integrina. Además se ha descrito un miembro de este grupo de moléculas (MAdCAM-1) que posee una región tipo mucina que le permite ser reconocida no sólo por integrinas, sino también por selectinas (Springer, 1994; Dustin y Springer, 1991; Shimizu et al., 1991).

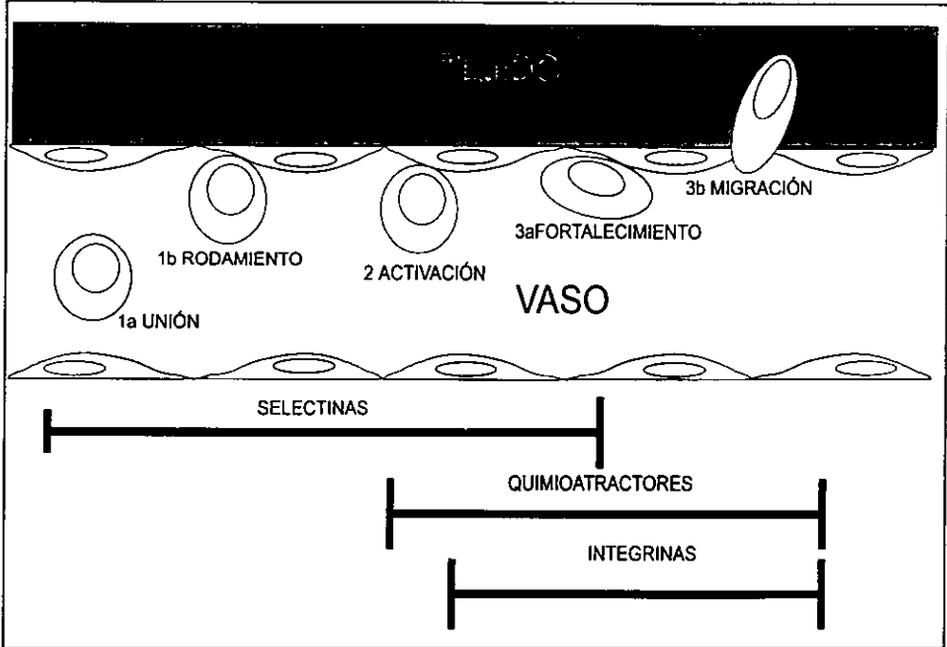


FIGURA 1. El modelo de código de área para el tráfico de leucocitos. En el esquema se ven las tres etapas que lleva a cabo un leucocito durante su migración al espacio extravascular. Las barras inferiores representan los periodos aproximados en los cuales las diferentes moléculas entran en acción. Durante estos tres pasos tanto las CE como los leucocitos participan activamente en el proceso mediante la expresión, secreción o activación de las diferentes moléculas.

El patrón de movimiento de granulocitos, linfocitos o monocitos hacia los diferentes tejidos es diferente dependiendo de la subpoblación y del tejido del que se trate. Estas diferencias parecen deberse al tipo de selectinas, integrinas, quimioattractores y moléculas de adhesión endotelial que participan en cada caso. Para poder entender el porque las

células inmunes presentan diferentes patrones de migración debe considerarse también que todas estas moléculas relacionadas con el tráfico de leucocitos se expresan de manera diferencial dependiendo del tipo de leucocito o endotelio del que se trate. En la figura 2 se representan esquemáticamente algunas de estas moléculas con sus ligandos y se ejemplifica como el modelo del código de área basado en esta gran variedad de moléculas explica la diferente movilidad de las células del SI dependiendo del tejido del que se trate (Springer, 1994; Gao e Issekutz, 1996).

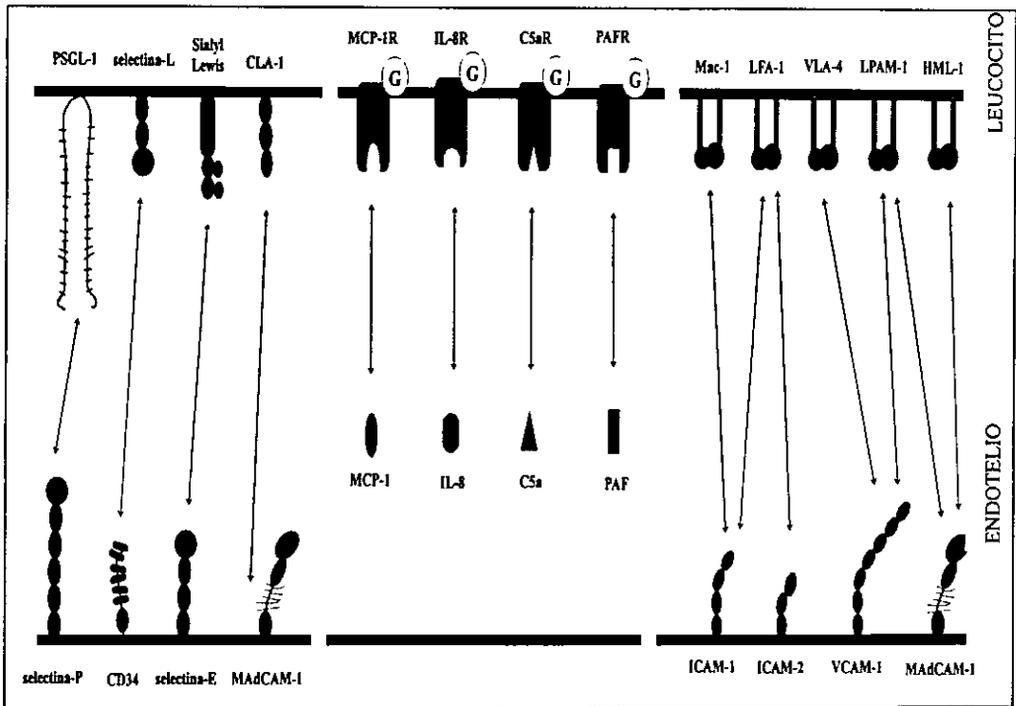


Figura 2 Algunas de las diferentes moléculas que intervienen en el tráfico de leucocitos. Según el modelo de código de área un leucocito que presente selectina-L rodará sobre el endotelio que exprese CD34, pero de todos los leucocitos que hayan rodado, si el endotelio secreta IL-8, sólo los leucocitos con receptores para IL-8 favorecerán su interacción con el endotelio y finalmente, si el endotelio expresa VCAM-1 iniciarán su movimiento hacia el tejido los leucocitos que expresen VLA-4. Así pues los diferentes patrones de migración de leucocitos se deben a una selección basada en el tipo de moléculas que expresen ambos tipos celulares (Figura tomada de Springer, 1994).

El tránsito de leucocitos entre los órganos linfáticos, el torrente sanguíneo y los tejidos se lleva a cabo continuamente en todo el organismo, sin embargo es durante el

proceso inflamatorio cuando el movimiento y acumulación de leucocitos en el tejido se incrementa considerablemente. Existen diferentes enfermedades como el cáncer, el síndrome de filtración capilar, el SIDA y algunas otras en las que el proceso de migración de leucocitos se encuentra alterado, lo cual pone en evidencia la importancia que tiene la extravasación de leucocitos para la sobrevivencia del organismo (Jain et al., 1996; Clauss et al., 1991; Vaillant et al., 1993; Ohkubo et al., 1991; Mier et al., 1989; Dhawan et al., 1995)

LA PROLACTINA Y SUS RECEPTORES

Hace ya varios años que se reconoció la interacción existente entre las células de los sistemas, inmune, nervioso y endócrino, de tal forma que hoy se habla de un sólo sistema integral llamado neuroinmunoendócrino. Esta integración hace referencia a la capacidad que tienen las células de cada uno de estos sistemas para regular mutuamente su actividad y función a través de diferentes mensajeros. Por ejemplo se ha demostrado que el estrés puede modificar la inmunocompetencia de los organismos (Glaser, 1990); que péptidos secretados por los leucocitos pueden regular la secreción de hormonas por parte de las glándulas endócrinas (Spangelo, 1989); o bien que las hormonas pueden funcionar como reguladoras de la respuesta inmune (Murphy et al., 1995; Berczi, 1997). Respecto a esto último, hace ya varias décadas se encontraron las primeras evidencias de que las hormonas hipofisarias tienen un papel en la regulación de la respuesta inmune. Smith en 1930 demostró que la pituitaria anterior es importante para mantener la integridad del timo; más tarde se encontró evidencia sobre la relación entre la pituitaria anterior y el sistema linfóide (Pierpaoli, 1967; Pierpaoli y Sorkin, 1968). Diane Russel (1988b) realizó una de las primeras revisiones sobre el papel de la prolactina (PRL) en la inmunomodulación.

La PRL es una hormona proteica descubierta hace más de 60 años (Riddle, 1932), que es codificada por un sólo gen en todas las especies. En el humano el gen se localiza en el cromosoma 6 y cuenta con cinco exones y cuatro intrones. En su forma nativa esta proteína pesa 23 kDa y consta de aproximadamente 199 residuos de aminoácidos dispuestos en cuatro α -hélices organizadas en un asa de cuatro hélices antiparalelas (Figura

3). Sin embargo se han descrito diferentes variantes de PRL que son producto de modificaciones postranscripcionales (procesamiento alternativo del mRNA) o postraduccionales (proteolisis, desaminación, glicosilación, fosforilación, sulfatación, dimerización o polimerización)(Sinha, 1995). Una de las variantes mejor conocidas es la PRL cortada que fue descrita por Mitra (1980), esta variante descrita para rata y humano puede generarse mediante proteolisis enzimática entre la tirosina 145 y la Leucina 146 (Clapp et al., 1993b; Sinha, 1995). La reducción del puente disulfuro intermedio de la PRL cortada produce dos fragmentos: uno de 16 kDa correspondiente al extremo N-terminal y otro de 7 kDa correspondiente al C-terminal (Sinha, 1995).



Figura 3. Representación de listón para la estructura tridimensional de la prolactina, modelada en base a estudios cristalográficos.

La PRL es producida y secretada principalmente por la adenohipófisis, aunque también se han reportado muchos más tejidos en los que esta hormona se produce, entre ellos la placenta, el útero, el cerebro, el SI, la próstata, la glándula lacrimal, etc. (Sinha, 1995; Ben Jonathan et al., 1996). Recientemente se ha reportado la expresión del gen de PRL en el endotelio (Clapp et al., 1998; Wu et al., 1996). Los efectos más conocidos de esta hormona son los que ejerce sobre la glándula mamaria y el sistema reproductor, sin

embargo se han descrito alrededor de 200 acciones más de la PRL en varias especies de vertebrados, algunas de ellas son la osmorregulación, el crecimiento, la inmunorregulación y recientemente se ha propuesto su participación en la formación de vasos capilares sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis (Bole-Feysot et al., 1998; Clapp et al., 1998).

Para llevar a cabo su amplia gama de efectos es necesario que esta hormona se una a receptores membranales, de los cuales existen diferentes variantes algunas ya caracterizadas. Los receptores para PRL ya clonados pertenecen a la superfamilia de receptores para citocinas/hematopoyetina que incluyen los receptores para hormona de crecimiento (GH), interleucina-2 y 7 (IL-2 β y γ , IL-7), GM-CSF, y otras. Esta superfamilia de receptores se caracteriza por tener dos dominios extracelulares (en los que se encuentran 4 cisteínas conservadas y el motivo triptofano-serina WS) y dos regiones intracelulares conservadas llamadas caja 1 y caja 2. Hasta hoy se han descrito tres isomorfos del receptor de PRL resultado del procesamiento alternativo del RNAm: el largo, el intermedio y el corto, los cuales varían únicamente en el tamaño de su región intracelular. Así mismo se ha encontrado en algunos fluidos una forma soluble del receptor producto de un procesamiento enzimático del receptor membranal (Postel-Vinay, 1996).

Para que el receptor a PRL se active es necesario que haya una homodimerización de dos receptores, lo que implica que la PRL posee dos sitios de unión al receptor. La unión entre el receptor y la hormona se establece cuando la PRL es reconocida en su sitio de unión 1 por un primer receptor y posteriormente la misma molécula es reconocida en su sitio de unión 2 por un segundo receptor. A este mecanismo de activación del receptor de PRL se le conoce como el modelo de dimerización (Fig. 4) (Fuh, et al., 1993; Bole-Feysot et al., 1998).

La cascada de señalización del receptor a PRL incluye la fosforilación de diferentes sustratos intracelulares entre los que sobresalen las cinasas de la familia Janus (principalmente JAK 2 activada por las tres isomorfos del receptor clonado); transductores de señal y activadores de transcripción (STAT 1, 3 y 5), que pueden ser activados por las

JAK's o cinasas de la familia Src (Fyn). Estos eventos tienen como resultado a su vez la activación de distintos sustratos intracelulares que son capaces de regular la expresión de diferentes genes. En la figura 5 se presenta un esquema de las vías de señalización para el PRL-R y algunos de los genes que regula de manera directa e indirecta (Bole-Feysot et al., 1998; Kooijman, 1996; Yu-Lee et al., 1998; Yu-Lee, 1997).

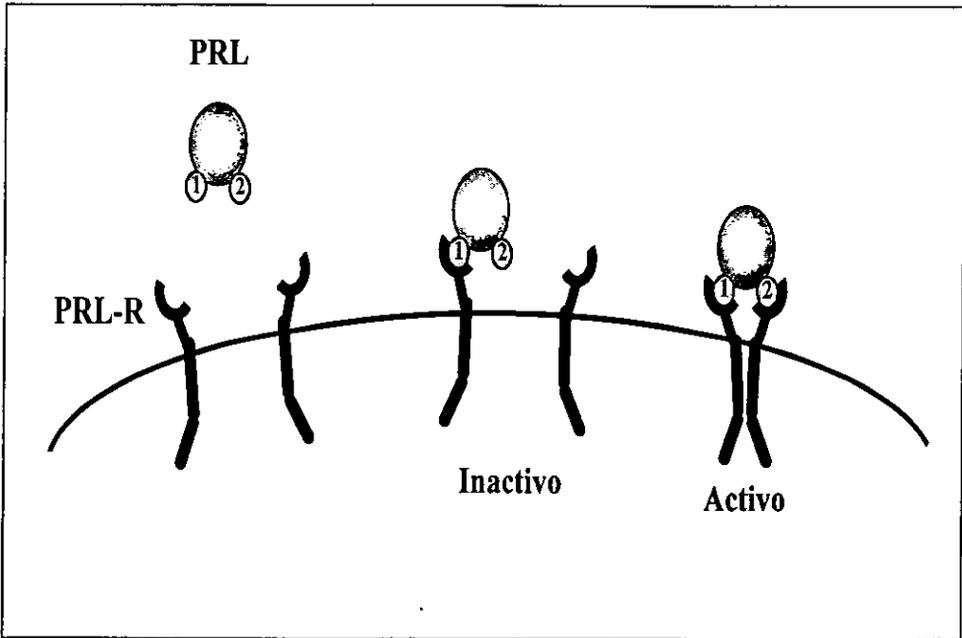


Figura 4 La activación del PRL-R se basa en la dimerización inducida por PRL. En un paso inicial la PRL se une a un PRL-R mediante su sitio de unión 1 formándose así un complejo hormona-receptor inactivo. Enseguida la PRL se une mediante su sitio de unión 2 a otro PRL-R lo que lleva a la homodimerización y activación del receptor (Tomado de Bole-Feysot et al., 1998)

Además de estos receptores ya clonados existen evidencias experimentales que indican la existencia de receptores específicos para el fragmento N-terminal de 16 kDa de la PRL, que no es activado por otras prolactinas incluyendo la PRL 23 kDa. Aunque su secuencia y mecanismos de señalización son desconocidas, las evidencias indican que estos receptores para PRL 16kDa parecen ser funcional y estructuralmente diferentes a los receptores ya clonados (Clapp y Weiner, 1992).

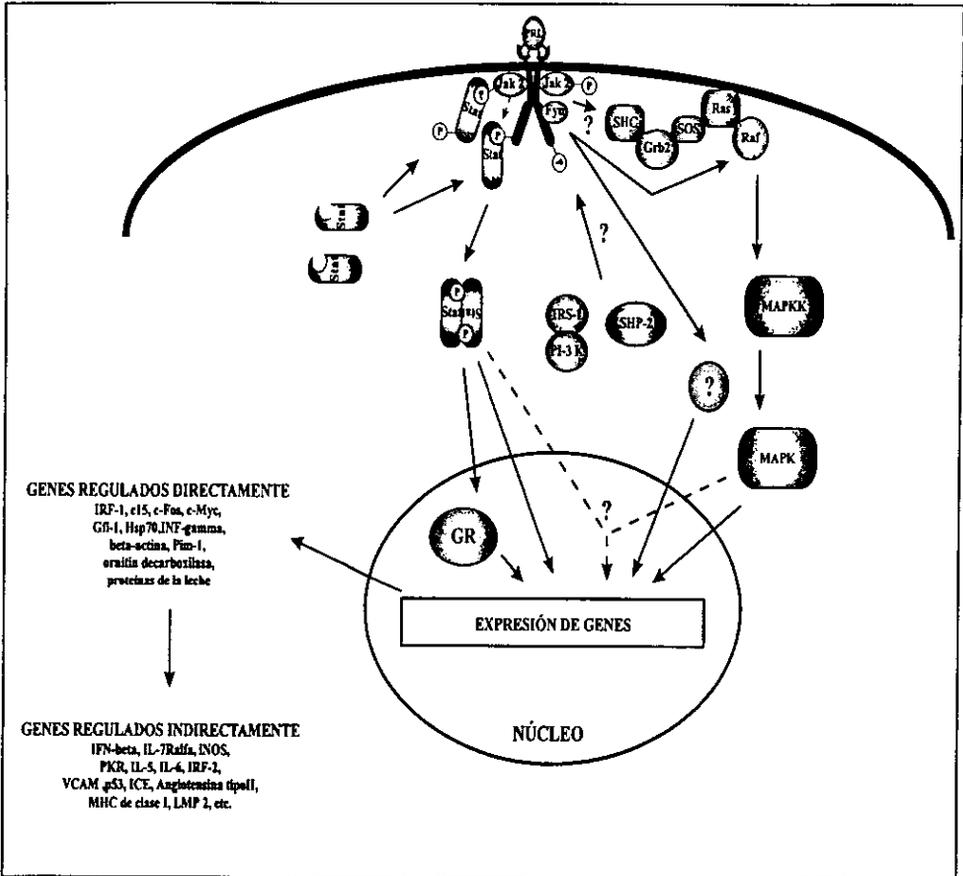


Figura 5. Representación esquemática de las vías de señalización del PRL-R. El PRL-R activa a Stat 1, Stat 3 y principalmente a Stat 5. La interacción de Stat 5 con el Receptor a Glucocorticoides (GR) ya se ha reportado. La vía de la cinasa MAP involucra la cascada de Shc, Grb2, Sos, Ras y Raf y al parecer también es activada por la isoforma corta del receptor, el cual también activa la vía de Jak 2 y de Fyn. Se han propuesto conexiones entre las vías de Jak, Stat y MAPK. Las interacciones entre el PRL-R y cinasas de la familia Src, SHP2, IRS-1, PI-3 y otras moléculas de transducción aún no están claras (Tomado de Bole-Feysot et al., 1998).

LA PROLACTINA Y EL SISTEMA INMUNE

Actualmente la PRL es considerada como una citocina. Desde fines de la década pasada se han hecho trabajos con diversas especies en los que se describe la producción de PRL o la presencia de su receptor en diferentes células y tejidos del SI. Tanto la PRL como

su receptor se encuentran ampliamente distribuidos en las células y tejidos del SI. Se ha detectado prolactina y su mRNA en células mononucleares, linfocitos, células NK, esplenocitos, timocitos, tumores leucémicos, diferentes líneas celulares de origen hematopoiético (U-937, YT, Hut 78, Jurkat, etc.) y en diferentes tejidos linfoides como el vaso, el timo y los nódulos linfáticos. Estos estudios se han llevado a cabo empleando diferentes técnicas: Western Blot, ELISA, bioensayo de células Nb2 (línea celular derivada de un linfoma murino, cuya proliferación depende de PRL), retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), "Northern Blot" e hibridación *in situ* (Gala et al., 1994; Montgomery et al., 1987; Montgomery et al., 1992; Pellegrini et al., 1992; Sabharwal et al., 1992; diMattia et al., 1988; Hatfill et al., 1990; Matera et al., 1991; diMattia et al., 1990; Wu et al., 1996; Gellersen et al., 1991). Por su parte el receptor a PRL ha sido detectado por medio de RT-PCR, citometría de flujo o experimentos de binding en células mononucleares, linfocitos B, T, timocitos, líneas celulares de origen hematopoiético (Jurkat, Hut-78, Molt-4, HL60, U-937, YT, etc.) y en tejidos linfoides (timo, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea e hígado) (Dardenne et al., 1994; Athreya et al., 1994; Leite-de-Moraes et al., 1995; Matera, 1991; Pellegrini et al., 1992; Ferrag et al., 1994).

Además existen evidencias sobre los efectos que tiene la PRL en la regulación de la función inmune tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Las primeras evidencias fueron obtenidas en ratas hipofisectomizadas en las cuales se desarrollaban enfermedades como anemia, leucopenia y trombocitopenia, además de presentar una respuesta humoral suprimida e hipersensibilidad de tipo retardada (Nagy y Berczi, 1989; Nagy et al., 1983a; Berczi, 1983). De igual manera al tratar ratas con bromocriptina (BCR)(agonista dopaminérgico y por lo tanto inhibidor de la secreción hipofisaria de PRL) se inhibe la producción de anticuerpos, se altera la proporción de marcadores de superficie de linfocitos en ratones neonatos, se suprime la habilidad de los linfocitos para responder, se reduce la activación de macrófagos dependiente de linfocinas y la producción de INF- γ por parte del bazo. En todos estos estudios la función linfo-hematopoiética se restablece con PRL exógena o implantando hipófisis bajo la cápsula del riñón para generar hiperprolactinemia (Nagy et al., 1983b; Russel et al., 1988; Hiestand et al., 1986; Bernton et al., 1988). También se ha observado que la proliferación de linfocitos T, B y células NK en respuesta

a diferentes mitógenos puede ser estimulada o inhibida por PRL dependiendo de la concentración (Matera et al., 1992). Se ha encontrado que niveles de PRL altos pueden incrementar la expresión de mRNA para IL-4 e IL-6 en esplenocitos de ratón; reducir los niveles en suero de IL-2 y reducir la actividad de células NK en mujeres (Lavalle et al., 1987; Vidaller et al., 1986; Gerli et al., 1986), en los últimos dos casos el tratamiento con BCR revierte los efectos observados. Además se ha observado que el rechazo a trasplantes de corazón se asocia con un incremento en los niveles circulantes de PRL previos al rechazo (Larson et al., 1985; Carrier et al., 1987). La PRL también ha sido reportada como un modulador de la interacción entre timocitos y las células epiteliales del timo estimulando la adhesión entre ambos tipos celulares (de Mello-Coelho, 1996); además se ha reportado que incrementa la actividad citotóxica de células NK (Matera et al., 1990; Matera, 1991). Asimismo la PRL se ha asociado con el desarrollo de diferentes enfermedades como algunas neoplasias de mama, de colon o de próstata en los que el nivel de PRL en suero es superior al normal (Ginsburg, 1995). Además actualmente se reconoce que la PRL es un factor permisivo para el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso y la Artritis Reumatoide (Sercarz, 1994).

Respecto al papel de la PRL en la biología de los linfocitos se han obtenido evidencias que involucran a esta proteína con sus patrones de activación. Sueros anti-PRL bloquean la proliferación inducida por PHA o ConA de linfocitos T humanos y de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2 (Sabharwal et al., 1992; Hartman et al., 1989). Se ha demostrado una acción coordinada entre la PRL y la IL-2 en la respuesta proliferativa de linfocitos T, en la maduración de células NK y en la generación de células asesinas activadas por linfocinas (LAK cells) (Clevenger et al., 1990; Cesano et al., 1994). De estas observaciones se ha planteado el modelo de activación en dos pasos de linfocitos T, en el cual la PRL y la IL-2 son considerados factores autócrinos necesarios para la progresión de ciclo celular (Figura 6) (Clevenger et al., 1992; Prytowsky y Clevenger, 1994). En apoyo a la acción autócrina de PRL sobre la proliferación de linfocitos T recientemente se ha reportado que esta hormona es producida por las células Jurkat (línea celular derivada de un linfoma de células Th) y que anticuerpos contra PRL inhiben la proliferación de estas células en cultivo (Matera et al., 1997). Así mismo se ha reportado que en células Nb2 la

expresión del receptor de célula T (TCR) es regulado por PRL y también que en estas mismas células el TCR y el receptor a PRL pueden fosforilar cinasas comunes como ZAP-70 (Krumenacker et al., 1998; Montgomery et al., 1998).

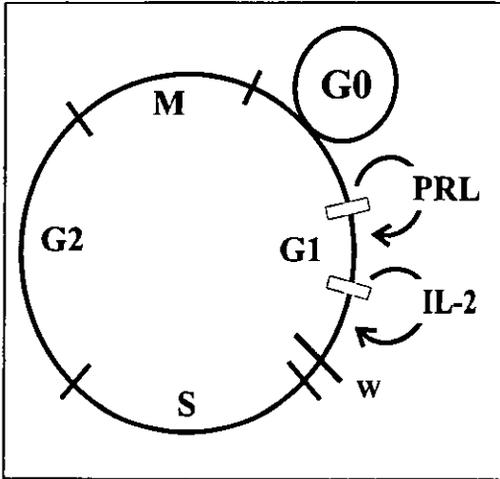


Figura 6. En el ciclo celular de los linfocitos T se propone que PRL e IL-2 son factores autócrinos necesarios para su progresión.

Tomando en cuenta esta información se propone que la PRL juega un papel relevante como modulador de la función de las células inmunocompetentes y por lo tanto de la función inmune. Si bien parece claro que esta hormona participa de varias maneras a diferentes niveles en esta regulación, se desconoce si la PRL tiene algún efecto sobre la interacción entre los leucocitos y el endotelio, interacción que es fundamental para el establecimiento y consolidación de la función inmune. Esta posibilidad es aún más fuerte si se toma en cuenta que además de los leucocitos también el endotelio son células blanco y productoras de esta hormona.

EFFECTO DE PRL SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR.

Como ya se mencionó anteriormente el endotelio es muy importante para la regulación de la función inmune, ya que interviene de manera directa y activa en el proceso de migración de los leucocitos del lecho vascular hacia los tejidos. Es precisamente en estas células en las que fue descrito el receptor específico para el fragmento amino-terminal de 16 kDa de la PRL (Clapp et al., 1993a). Este fragmento es

capaz de inhibir la angiogénesis (formación de vasos capilares nuevos) *in vivo* como se demuestra en el ensayo de la membrana corioalantoidea del pollo y el de la córnea de la rata; estos efectos parecen involucrar la activación de receptores específicos del endotelio (Clapp et al., 1993b; Dueñas et al., 1998). La PRL de 16 kDa inhibe además la proliferación de CE en cultivo provenientes de diferentes especies y la asociación de estas células en estructuras capilares en geles de colágena tipo I (Clapp et al., 1993b). Por otra parte se han obtenido resultados que evidencian la producción de PRL por parte de las CE y sus efectos autócrinos sobre la proliferación endotelial (Clapp et al., 1998).

En este contexto planteamos que la PRL es una molécula capaz de regular la interacción entre las células endoteliales y los leucocitos, particularmente la adhesión entre ambos tipos celulares, que como ya se ha mencionado, es fundamental para la función inmune.

HIPÓTESIS

“La prolactina participa en la regulación de la interacción entre las células inmunocompetentes y el endotelio vascular.”

OBJETIVO GENERAL

Analizar si la prolactina modifica la adhesión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a endotelio de la vena umbilical humana (HUVEC).

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Establecer un método que permita evaluar la capacidad de adhesión de PBMC a HUVEC.
- 2.- Determinar si la PRL recombinante de 23 kDa y/o el fragmento de 16 kDa modifican la adhesión de PBMC a HUVEC.
- 3.- Analizar la posible participación de PRL endógena sobre la adhesión de PBMC a HUVEC mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-prolactina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para analizar el posible efecto de PRL sobre la adhesión a endotelio de células inmunes se empleó el ensayo de adhesión descrito por Shimizu y cols. (1991). Este ensayo se basa en el uso de células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) en las que se induce la expresión de moléculas de adhesión (principalmente selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1) mediante la incubación con citocinas proinflamatorias (IL-1 β , INF- γ , etc.). Una vez que el endotelio se ha activado éste se incuba por 30-60 min con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) previamente tratadas. Al final de este periodo las células no adheridas se retiran del plato de cultivo y la cuantificación de las células adheridas se lleva a cabo de acuerdo al método empleado para su marcaje. Es importante señalar que es conveniente que ambos tipos celulares sean de la misma especie, ya que de esta manera se logra que las moléculas de adhesión sean reconocidas de forma específica por sus ligandos (Johnston et al., 1990). A continuación se describen en detalle los métodos seguidos en las diferentes etapas necesarias para llevar a cabo este ensayo.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS

a. HUVEC

Para la obtención de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se empleó el método descrito por Sironi y cols (1989). Se obtuvieron cordones umbilicales de partos normales los cuales fueron lavados con solución salina de Hank's (HBSS/GIBCO) adicionada con 10 U/ml de penicilina y 10 μ g/ml de estreptomycin (GIBCO). Posteriormente el cordón y la vena del cordón fueron lavados 3-5 veces con esta misma solución para retirar la sangre acumulada. Enseguida la vena fue sellada por uno de sus lados e incubada 10 min a 37 °C y 5% de CO₂ con 10-15 ml de tripsina-EDTA al 0.5% (GIBCO). Al final de la incubación se recuperó la suspensión de células en tripsina y se centrifugó por 10 min a 200 X g. El paquete de células fue resuspendido en medio de

cultivo M-199 (GIBCO) y sembrado en cajas de cultivo de 6 pozos (COSTAR) cubiertas con fibronectina de plasma humano ($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (GIBCO), estos cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO_2 . El medio de cultivo fue suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino (GIBCO), 10 U/ml de penicilina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina (GIBCO) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Suplemento de Crecimiento para Células Endoteliales (ECGS/SIGMA). El medio de cultivo se cambió cada tercer día.

b. PBMC

Mediante el uso del Vacutainer se obtuvo sangre periférica de donadores sanos de sexo masculino de entre 25-40 años que no hubieran presentado enfermedades ni síntomas durante la semana previa a la extracción. La sangre obtenida se colocó en proporción 1:1 sobre una cama de Histopaque-1077 (SIGMA) en tubos de 15 ml (COSTAR) y se centrifugó 30 min a 400 X g con el fin de separar las células mononucleares. Las células recuperadas se lavaron una vez con medio de cultivo (Opti-MEM/GIBCO) y posteriormente se sembraron en cajas de 6 pozos (COSTAR) a una densidad de 1×10^6 células por ml. El medio fue suplementado con 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de NUTRIDOMA-HU (Boheringer), 10 U/ml de penicilina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (GIBCO).

ENSAYO DE ADHESIÓN

a. TRATAMIENTO Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS

HUVEC pasaje 4 se sembraron y dejaron crecer por 48 horas o hasta su confluencia en cajas de 96 pozos (o 48 para los experimentos con fluorescencia) (COSTAR) cubiertas con gelatina al 0.1% (SIGMA). Para inducir la expresión de moléculas de adhesión estos cultivos fueron incubados a 37°C 4 h previas al ensayo con 1 ng/ml de interleucina-1 β (IL-1 β /Genzyme) y posteriormente lavadas con medio de incubación sin la citocina.

Las PBMC se mantuvieron por 10 ó 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 antes de ser empleadas en los experimentos. Las células fueron tratadas inmediatamente después de su

obtención con diferentes concentraciones de PRL 23 kDa, 16 kDa (donación de Martial, Universidad de Lieja, Bélgica), anticuerpos monoclonales anti-PRL 23 kDa (01 y 02 de Genzyme), anti-16 kDa (1G8) o bien interleucina-2 recombinante humana (IL-2, GIBCO). Los cultivos empleados como controles de adhesión máxima se incubaron sin tratamiento, únicamente se activaron durante 20 min previos al ensayo con 10 ng/ml de ester de forbol (PMA/SIGMA), al final de esta activación los cultivos se lavaron con medio de cultivo nuevo.

b. MARCAJE DE LAS PBMC

Después del tratamiento y/o activación las PBMC fueron marcadas mediante dos métodos diferentes para poder evaluar su adhesión a HUVEC.

- 1) Marcaje con el fluoróforo 4',6 diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro (DAPI). Las PBMC de cada cultivo se recuperaron por centrifugación durante 10 min a 200 X g, se resuspendieron en medio nuevo a una concentración de 1×10^6 células/ml y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 120 min en una solución de 1 µg/ml de DAPI (Boheringer) con 2% de etanol absoluto. Al final de esta incubación las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en medio hasta una concentración de 5×10^5 células/ml.
- 2) Marcaje con cromato [⁵¹Cr] de sodio. Las PBMC de cada cultivo se recuperaron mediante centrifugación durante 10 min a 200 X g se resuspendieron en medio nuevo a una concentración de 1×10^7 células/ml y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante una hora en medio de cultivo con 1% de BSA (SIGMA) y 500 µCi/ml de cromato [⁵¹Cr] de sodio (NEN) agitando cada 15 min. Al final de esta incubación las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas en medio hasta una concentración de 5×10^5 células/ml.

c. COINCUBACIÓN

Una vez marcadas la PBMC se agregaron 5×10^4 células a cada pozo de las cajas de 96, ó 5×10^5 células por pozo en las cajas de 48 pozos. Los cocultivos se incubaron a 37 °C y

5% de CO₂ por 40-50 min, al cabo de cuyo periodo las células no adheridas fueron retiradas lavando dos veces cada pozo con PBS a 37 °C.

d. CUANTIFICACIÓN

- 1) Fluorescencia. Las células adheridas marcadas con el fluoróforo DAPI se cuantificaron de dos formas: 1) mediante conteo del número de células con un microscopio de epifluorescencia o bien 2) mediante la evaluación de la fluorescencia en un espectrofluorómetro. Para el primer método los cocultivos fueron fijados con paraformaldehído (Baker) al 4% y las células fluorescentes contadas en nueve campos ópticos por condición. Para el segundo caso los cocultivos fueron cosechados con Tripsina-EDTA, resuspendidos en PBS y evaluados con una λ de excitación de 360 nm y una λ de emisión de 460 nm.
- 2) Radioactividad. A cada uno de los pozos se le agregaron 200 μ l de una solución al 0.1% de SDS y 25 mM de NaOH con el fin de lisar las células adheridas. La radioactividad de los lisados celulares se analizó en un contador de emisiones γ (Packard). Los valores reportados son promedios de quintuplicados y se expresan en porcentajes respecto al total de cuentas por minuto para 5×10^4 células del mismo cultivo calculados con la fórmula:

$$\frac{(\text{valor experimental}) (100)}{\text{cpm totales}} = \text{\% de adhesión respecto al total de céls.}$$

e. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para conocer si los resultados obtenidos fueron diferentes estadísticamente se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa STATISTICA.

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO DE ADHESIÓN

Con el propósito de establecer un ensayo reproducible para medir la adhesión de los leucocitos a endotelio, inicialmente se llevaron a cabo experimentos basados en técnicas histológicas. Los cocultivos fueron fijados con paraformaldehído y teñidos con azul de toluidina, de esta forma se pudieron visualizar los cocultivos de HUVEC confluentes con los leucocitos adheridos (Fig. 8). Para poder cuantificar la adhesión de las PBMC, éstas fueron marcadas con DAPI (fluoróforo con afinidad por DNA) antes de incubarlas con el endotelio, de esta manera las células fluorescentes fueron fotografiadas y contadas con un microscopio de epifluorescencia para cada una de las dos condiciones (adhesión basal y adhesión estimulada por PMA e IL-1 β)(Fig. 9). En otra serie de experimentos la fluorescencia de las PBMC adheridas se evaluó con un espectrofluorómetro para estas mismas condiciones. Mediante estos dos tipos de cuantificación se detectó un aumento significativo de la adhesión cuando ambos tipos celulares fueron estimulados (Fig. 10), sin embargo este aumento no fue de la magnitud esperada según reportes hechos por otros autores para estas condiciones (Shimizu et al., 1991; Jonjic et al., 1992).

Adicionalmente se llevaron a cabo experimentos con PBMC marcadas con ^{51}Cr cultivadas 10 o 72 h para evaluar posibles diferencias de adhesión a distintos tiempos de incubación. En la figura 11 se presentan los porcentajes de adhesión de PBMC obtenidas de cuatro individuos en cuatro condiciones (adhesión basal o estimulada con IL-1 β y/o PMA). Estos resultados indicaron que la adhesión de las PBMC a HUVEC se incrementa de manera proporcional respecto a la adhesión basal en las cuatro condiciones probadas sin importar el tiempo de incubación. Así mismo estos experimentos mostraron que la adhesión basal varió del 5 al 15%, sin embargo cabe apuntar que con 72 h de cultivo la adhesión basal de las PBMC se mantuvo dentro de un rango menor. Por lo anterior se decidió establecer 72 h como tiempo estándar de incubación para todos los experimentos

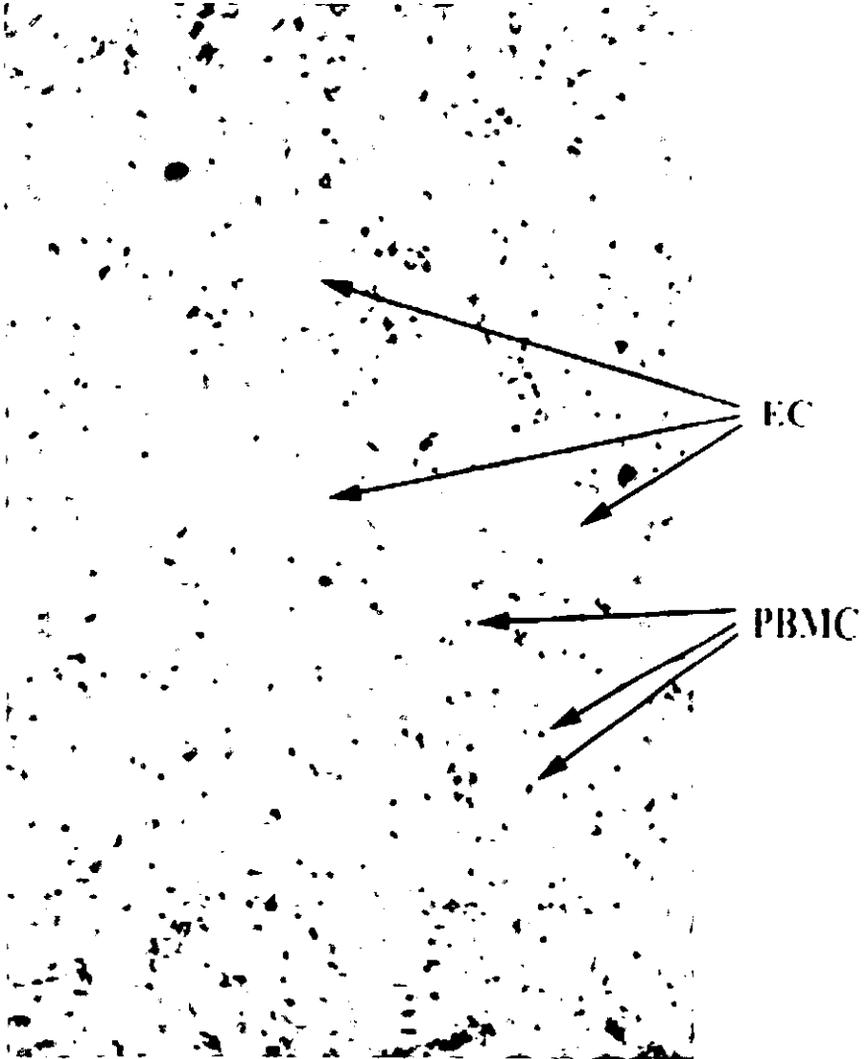


Figura 8. Cultivo confluyente de HUVEC fijado y teñido con azul de toluidina en el que se aprecian las PBMC adheridas.

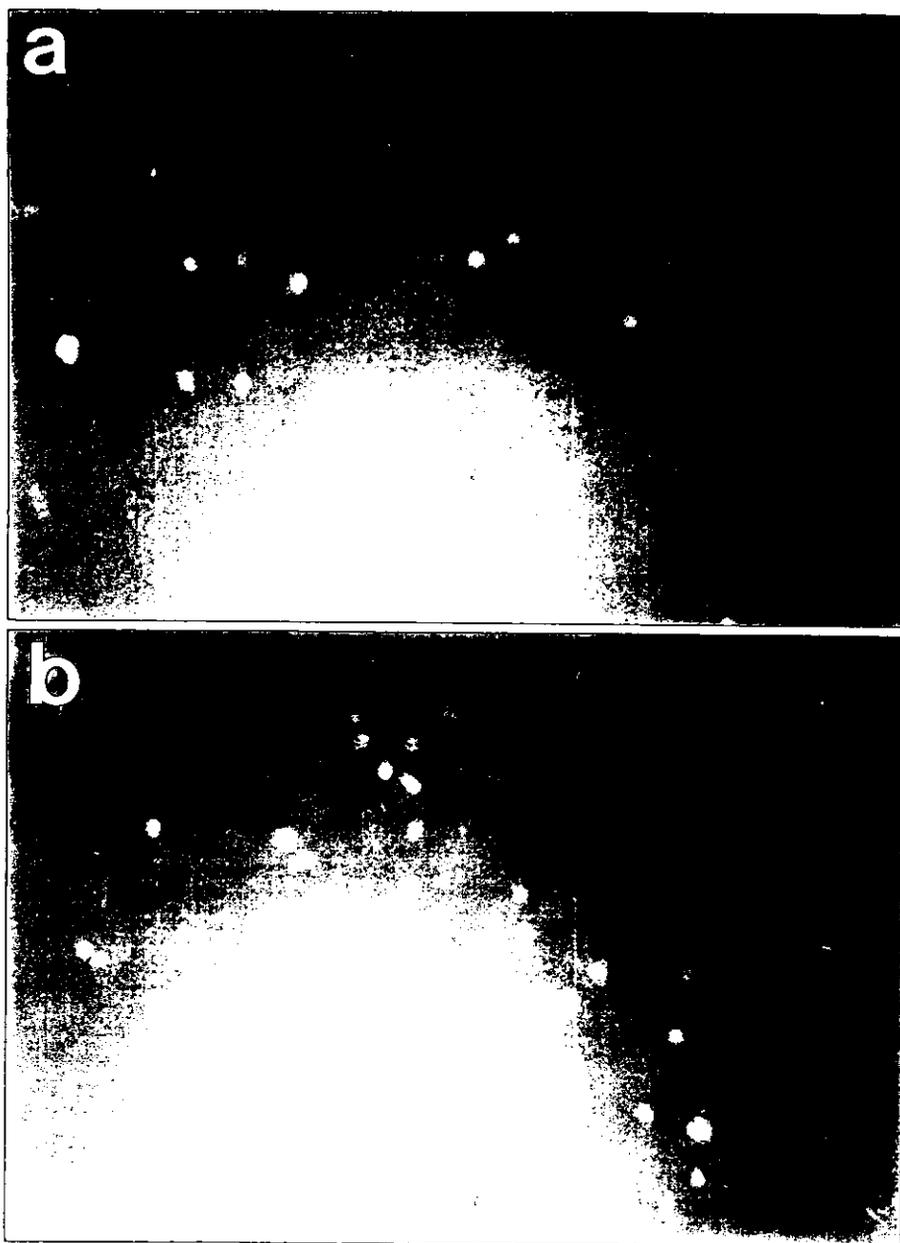


Figura 9. PBMC marcadas con DAPI adheridas a HUVEC. a) Campo representativo de la adhesión basal. b) Campo representativo de la adhesión estimulada con PMA e IL-1. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con una λ de excitación de 360 nm y una λ de emisión 460 nm.

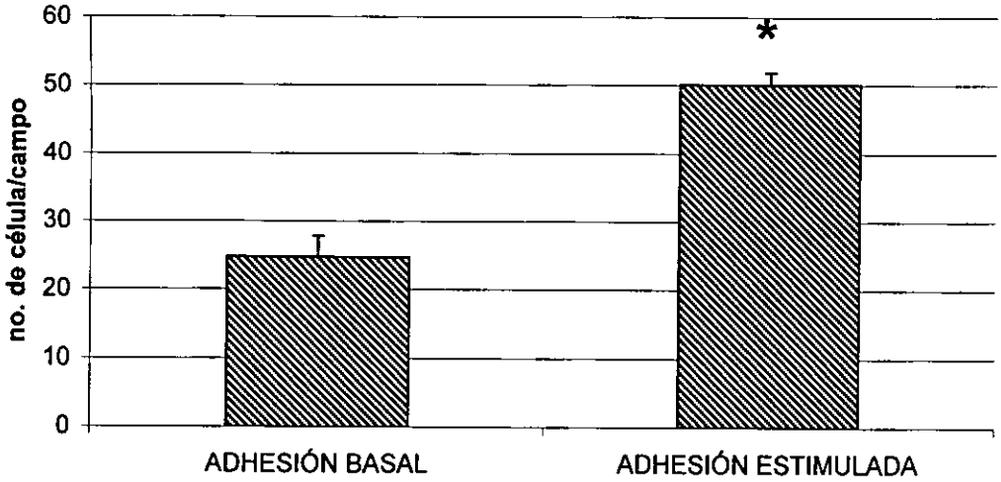
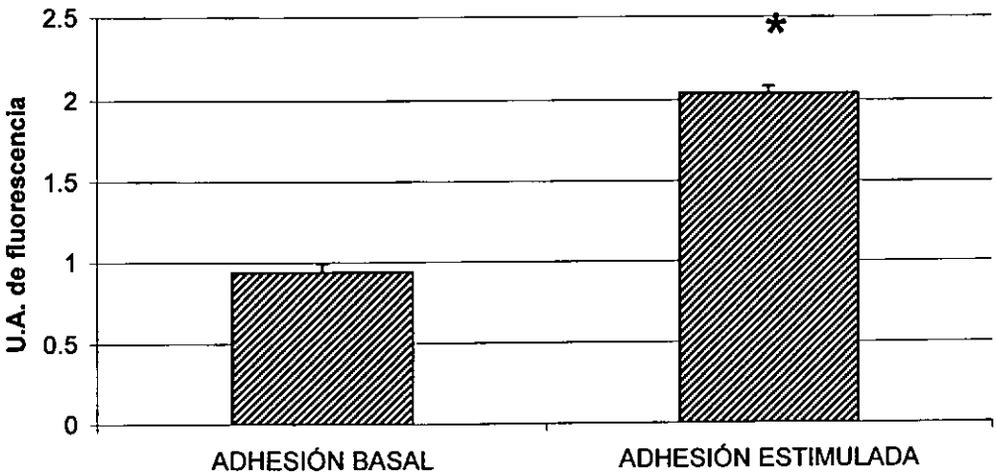
A**B**

Figura 10. Promedio de la adhesión basal y estimulada de PBMC marcadas con DAPI a HUVEC evaluada por **A** conteo en microscopio (n=9) y **B** porcentaje de fluorescencia (n=10). Para la adhesión estimulada se trató con PMA a las PBMC y con IL-1 a las HUVEC. U.A. Unidades Arbitrarias de fluorescencia. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA.

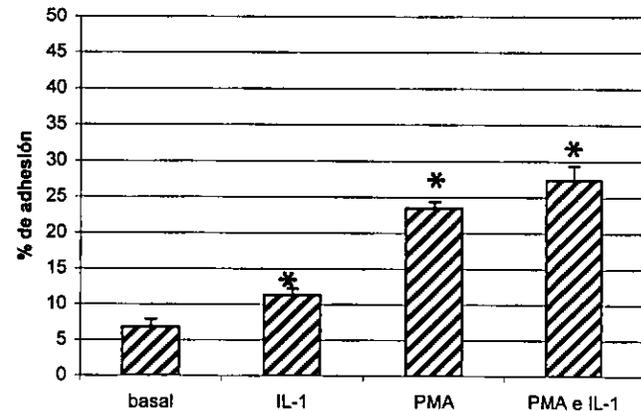
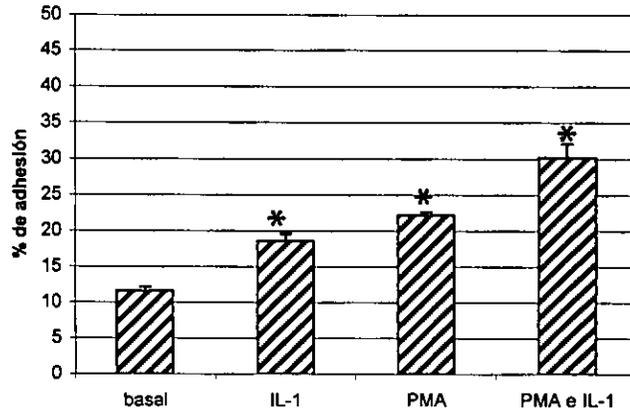
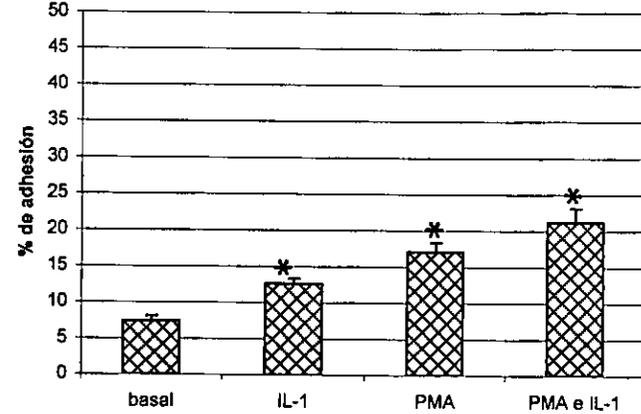
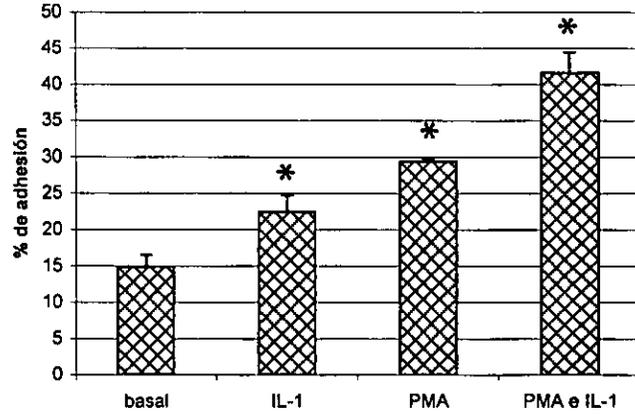


Figura 11. Experimentos representativos del promedio de adhesión a HUVEC de PBMC cultivadas durante 10 (fila superior) o 72 h (fila inferior). * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA.

subsecuentes, dado que otros autores además han reportado que se requieren de 72 h de incubación con IL-2 para incrementar la capacidad de adhesión de leucocitos (Pankonin et al., 1992). En estos mismos experimentos quedó de manifiesto que la activación de las PBMC con PMA y del endotelio con IL-1 β aumenta significativamente la adhesión de los leucocitos al endotelio, sin embargo el efecto de la estimulación con PMA fue siempre mayor al efecto obtenido con la estimulación con IL-1 β ; así mismo se observó que al activar las PBMC y las HUVEC se obtuvo la adhesión máxima.

Tomando en cuenta los resultados hasta aquí descritos, se decidió llevar a cabo la parte experimental de este proyecto empleando el método basado en el uso de radioactividad, ya que este método fue capaz de detectar diferencias de adhesión dentro de los rangos ya reportados para las mismas condiciones control. Además este método fue el más práctico según del número de horas de trabajo empleadas para la obtención de resultados y la cantidad de material biológico y de cultivo necesarios.

EFECTO DE PROLACTINA HUMANA.

El efecto sobre la adhesión a HUVEC del tratamiento de PBMC con PRL en tres de los cuatro individuos probados mostró un aumento significativo ($p < 0.05$ ANOVA) de la adhesión de estas células respecto al control no tratado con PRL con cuando menos una de las concentraciones analizadas (Fig. 12). Este incremento fue de hasta 1.3 veces la adhesión registrada para las células no tratadas con PRL y se obtuvo con diferentes concentraciones de PRL para cada individuo. La concentración más alta de PRL (200 ng/ml) fue la única que nunca tuvo efecto sobre la adhesión de las células de los individuos probados. Cabe señalar que la adhesión basal de las PBMC de los individuos B y D en la condición control fue mayor a 27 %.

Con el objetivo de analizar el efecto de PRL sobre la capacidad de adhesión de las PBMC a CE en el grupo de los cuatro individuos y hacer un promedio del efecto, los

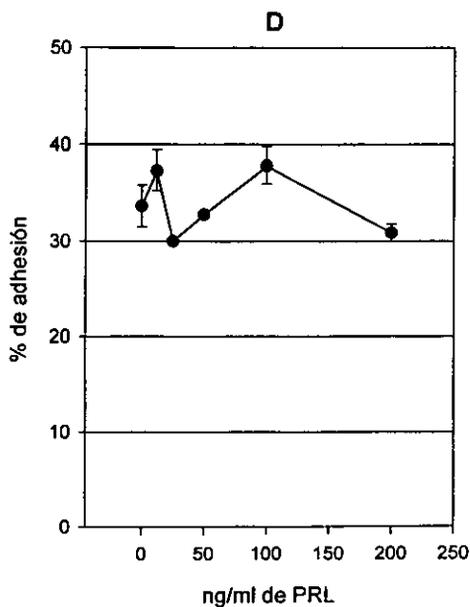
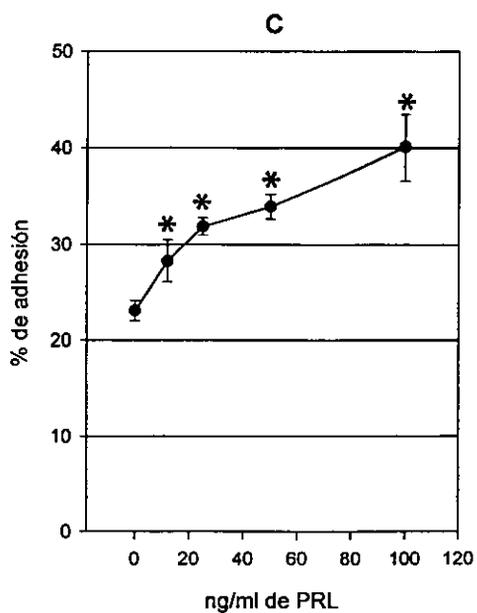
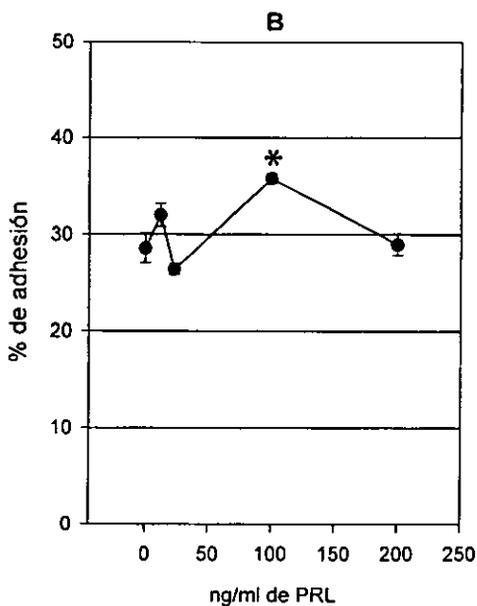
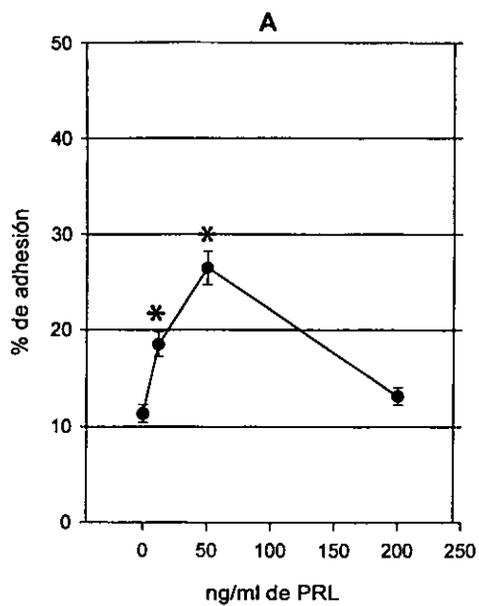


Figura 12. Efecto de PRL humana 23 kDa sobre la adhesión de PBMC a HUVEC. Cada una de las gráficas (A,B,C,D) representa un experimento independiente realizado con PBMC de un individuo. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA.

valores experimentales en cuentas por minuto obtenidos de cada individuo de cada tratamiento fueron normalizados considerando la media del control como el 100% de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{(\text{valor experimental}) (100)}{(\chi \text{ del control})} = \frac{\% \text{ de adhesión respecto al}}{100\% \text{ (o control)}}$$

Posteriormente los valores en porcentaje respecto al control (o 100%) de todos los individuos fueron promediados en función de la concentración de PRL para construir así la curva del efecto promedio de PRL sobre la capacidad de adhesión de células mononucleares a endotelio. De esta manera se observó que las concentraciones de 12.5, 50 y 100 ng/ml de PRL 23 kDa provocaron un incremento significativo ($p < 0.05$ ANOVA) de entre 0.3 a 0.4 veces respecto al control sin PRL sobre la capacidad de adhesión a endotelio de las células mononucleares. Por su parte las concentraciones de 25 y 200 ng/ml de PRL no tuvieron efecto (Fig. 13).

Así mismo se determinó la capacidad de adhesión a endotelio de células mononucleares de un individuo (A) incubadas con distintas concentraciones del segmento aminoterminal de 16 kDa de PRL humana. Los resultados obtenidos señalaron que con 100 ng/ml de esta variante de PRL hubo un aumento significativo ($p < 0.05$ ANOVA) de aproximadamente 0.79 veces de la adhesión respecto al control sin PRL. Por su parte las concentraciones de 50 ng/ml y 500 ng/ml no tuvieron efecto sobre la capacidad de adhesión de las células (Fig. 14).

EFFECTO DE IL-2 Y PROLACTINA HUMANA 23 kDa.

Con el fin de comparar el efecto estimulador producido por PRL con el efecto de otra citocina que ya ha sido reportada como promotora de la adhesión a endotelio de diferentes células del Sistema Inmune (Pankonin, 1992; Bianchi, 1993; Allavena, 1996), se analizó la adhesión a endotelio de PBMC obtenidas del individuo C previamente tratadas

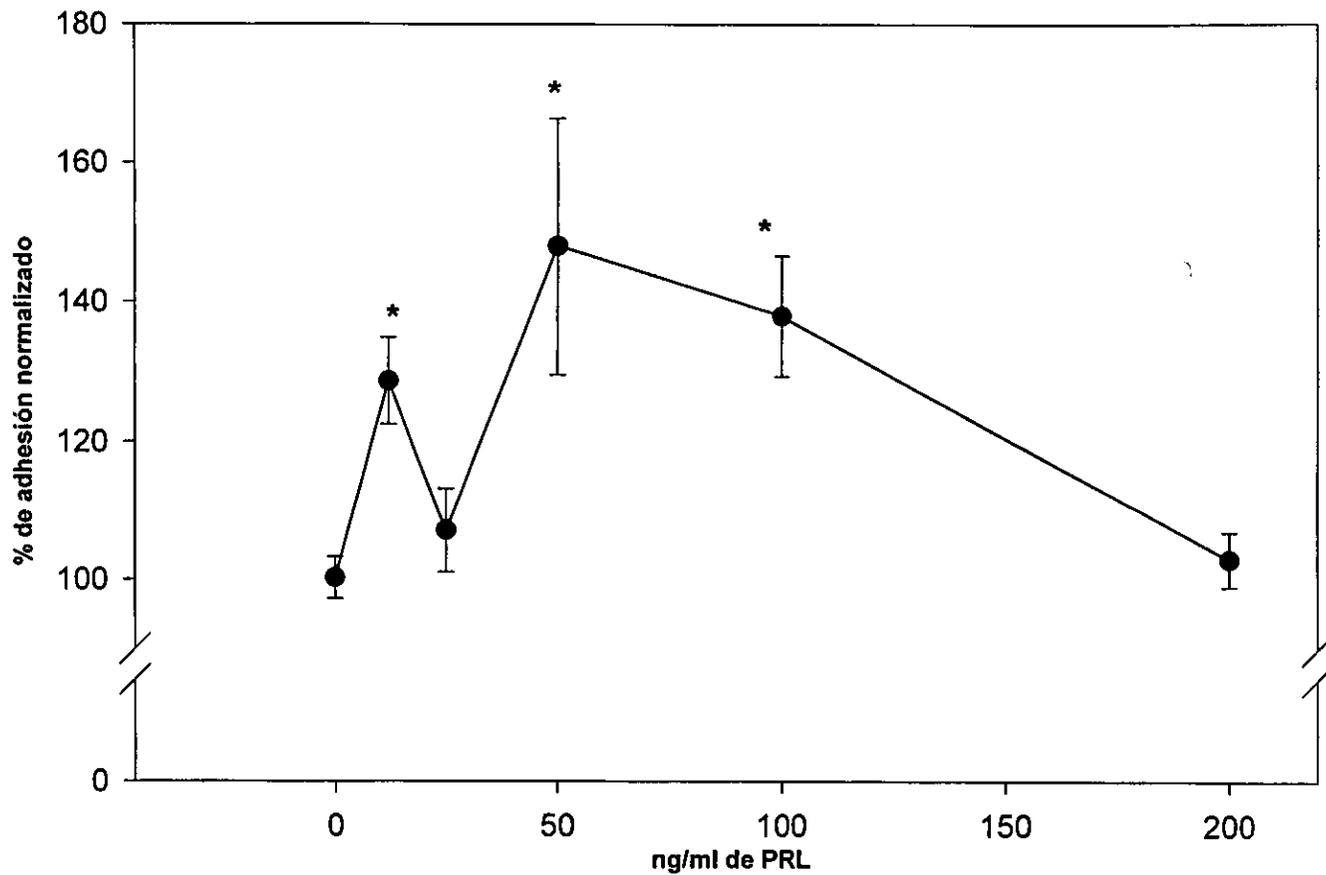


Figura 13. Promedio del efecto de PRL 23 kDa sobre la adhesión de PBMC a HUVEC. Los resultados obtenidos de los individuos A, B, C y D fueron normalizados y promediados. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA.

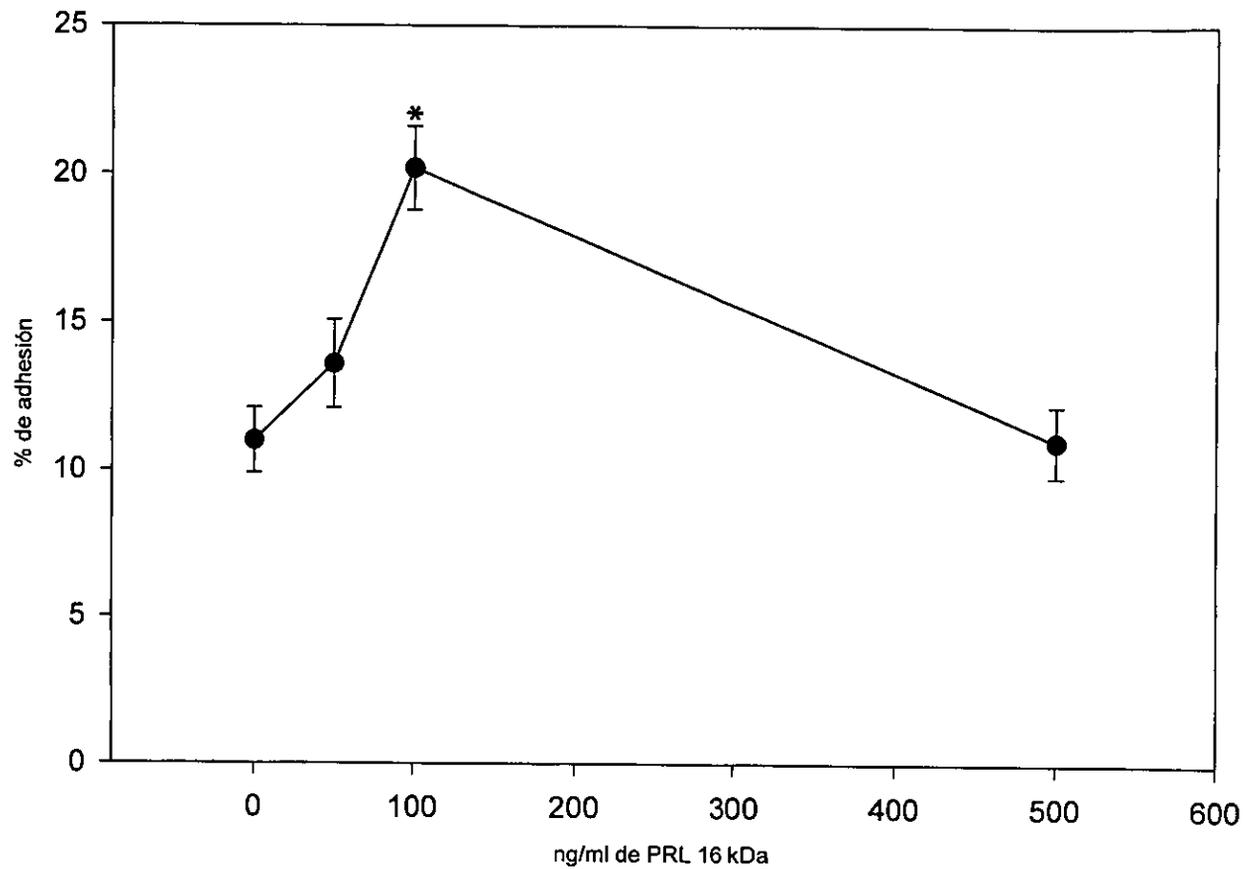


Figura 14. Efecto de PRL humana 16 kDa sobre la adhesión de PBMC a HUVEC. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA.

con dos concentraciones de IL-2, con una concentración de PRL o con ambas citocinas. El tratamiento con IL-2 produjo un aumento significativo ($p < 0.05$ ANOVA) en la adhesión respecto al control que fue dosis-dependiente, mientras que el tratamiento con PRL provocó un incremento similar al obtenido con 50 U/ml de IL-2. La combinación de ambas citocinas indujo un aumento de la adhesión no significativamente ($p < 0.05$ ANOVA) diferente del obtenido con ambas moléculas por separado (Fig. 15).

EFFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES anti-PROLACTINA.

Con la finalidad de bloquear un posible efecto de PRL endógena de las PBMC sobre su capacidad de adhesión a HUVEC, se emplearon tres diferentes anticuerpos monoclonales anti-PRL humana, dos de ellos dirigidos contra PRL (01 y 02) y el otro (1G8) dirigido contra la PRL de 16 kDa. Estos tres anticuerpos son capaces de reconocer ambas variantes de PRL en ensayos de Western Blot. La incubación de los cultivos de PBMC con $1\mu\text{g/ml}$ de los diferentes anticuerpos monoclonales anti-PRL generó una disminución de la adhesión respecto al control tratado con IgG preinmunes de ratón (Fig. 16).

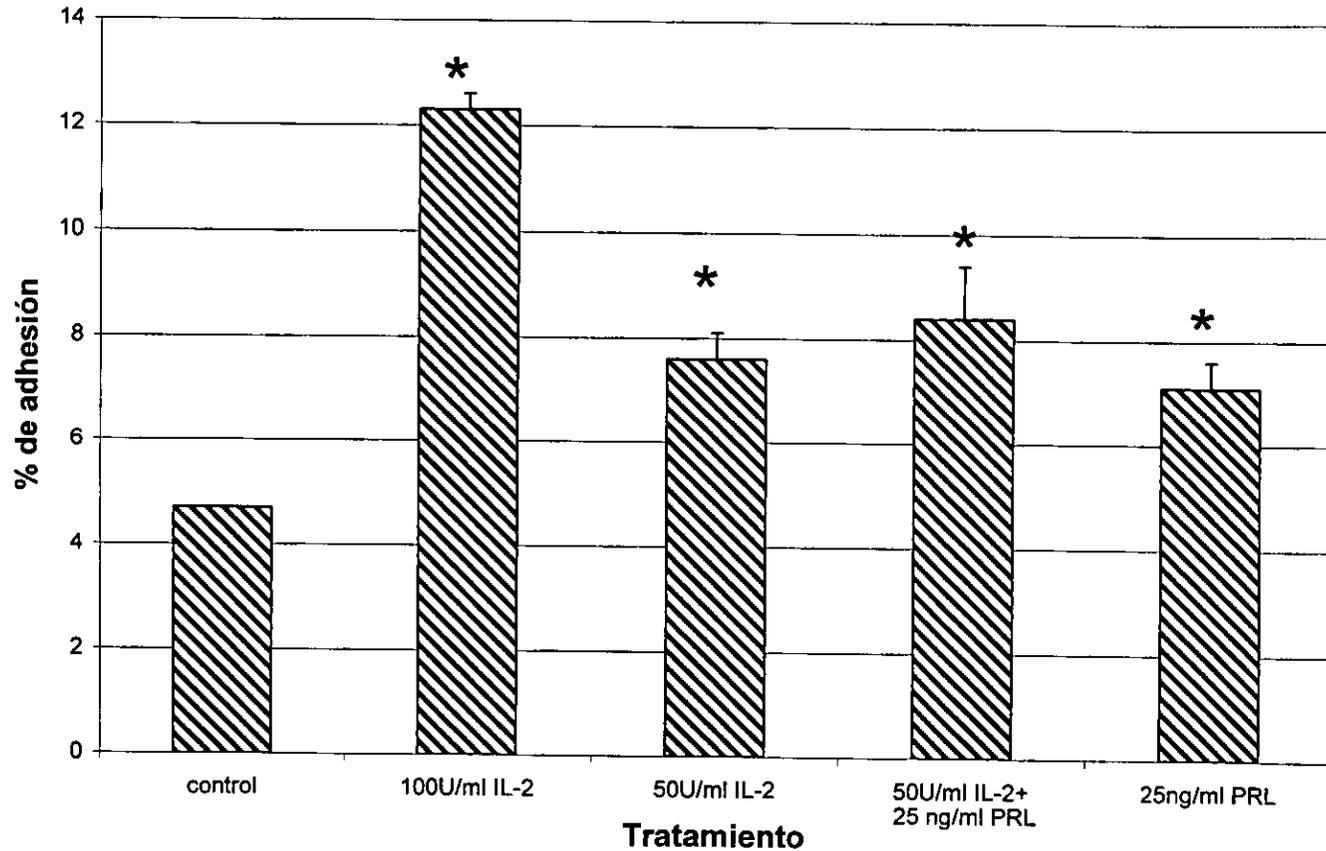


Figura 15. Efecto de IL-2h y PRLh 23kDa sobre la adhesión de PBMC a HUVEC. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA

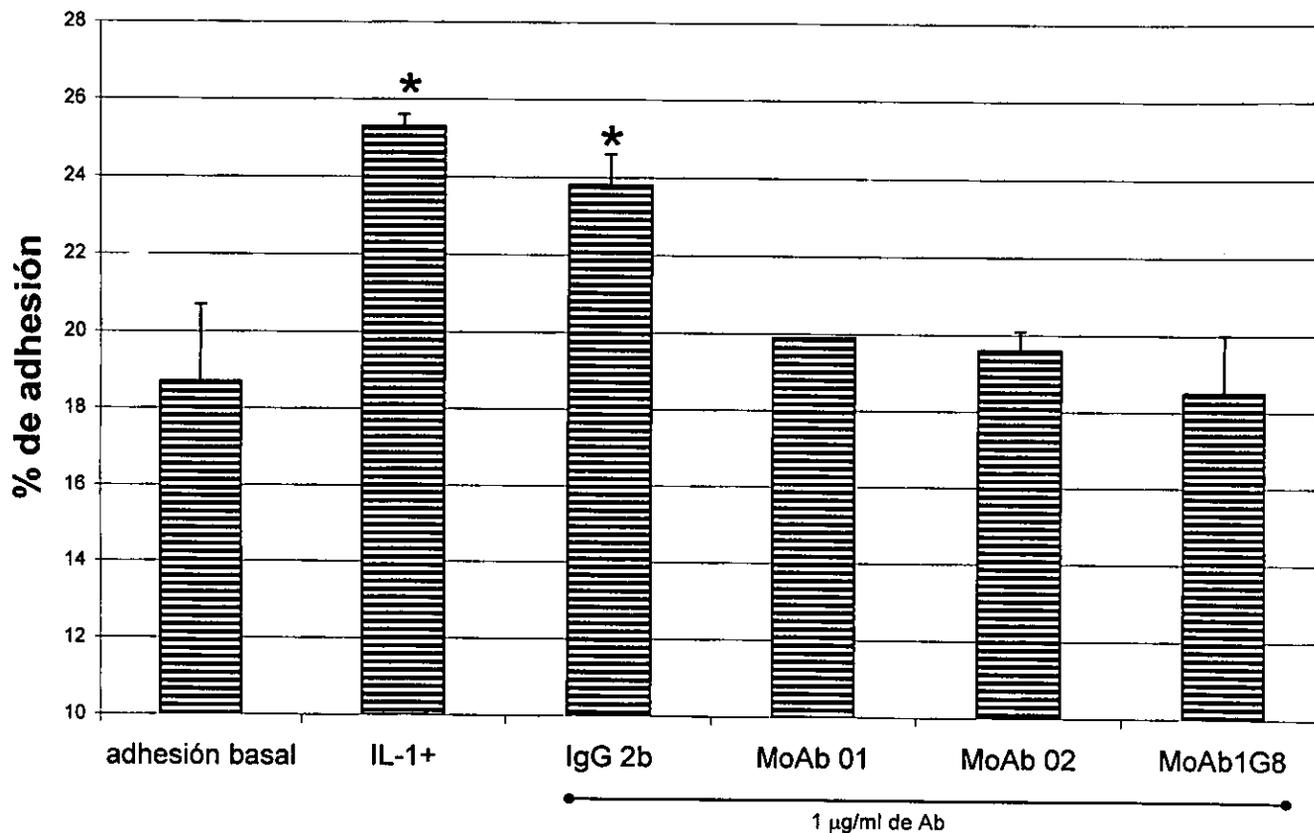


Figura 16. Efecto de diferentes anticuerpos monoclonales (MoAb) anti-PRL sobre la adhesión de PBMC a HUVEC. En todos los casos excepto en la adhesión basal las HUVEC fueron tratadas con 1 µg/ml de IL-1β. La inmunoglobulina G del subtipo 2b (IgG 2b) fue empleada como MoAb control. * = diferente del control $p < 0.05$ por ANOVA

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ADHESIÓN

La cuantificación de la adhesión celular para dos condiciones control (adhesión basal y estimulada) basada en el conteo directo del número de células en microscopio, en la evaluación mediante espectrofluorómetro y en la detección de marca radioactiva mostraron que la adhesión empleando PMA e IL-1 β fue significativamente mayor a la adhesión basal (Figs. 10 y 11). Sin embargo el incremento detectado (2 veces la basal) mediante el uso del fluoróforo fue menor al detectado mediante el uso de radioactividad (de 3 hasta 5 veces la basal) y al ya reportado anteriormente en la literatura bajo estas mismas condiciones para células TCD4+ (hasta 10 veces la basal) o monocitos (hasta 3 veces la basal)(Shimizu et al., 1991; Jonjic et al., 1992). Las diferencias de adhesión detectadas mediante ambos métodos en la misma condición se deben muy probablemente a que el marcaje las PBMC con el fluoróforo depende de incubar a las células en una solución con etanol, el cual se sabe es capaz de reducir la adhesión de leucocitos (Shreiner y Hopen, 1979). Por esta causa, además de los motivos prácticos mencionados en la sección anterior, se decidió llevar a cabo los experimentos subsecuentes usando el método basado en radioactividad.

En los experimentos realizados con ^{51}Cr (Fig. 11) se observó que la adhesión estimulada con PMA e IL-1 β fue máxima y similar a la reportada por Jonjic y cols. (1992) para monocitos, aunque fue menor en comparación a los experimentos reportados para linfocitos T CD4+ por Shimizu y cols. (1991). Esto puede deberse a que cuando los leucocitos son activados los niveles de adhesión se elevan en diferente proporción dependiendo de la subpoblación que se utiliza para llevar a cabo los experimentos (linfocitos T CD4+, monocitos o PBMC), lo cual puede entenderse si se toma en cuenta que las células del SI se adhieren de manera diferencial al endotelio dependiendo de la subpoblación de la que se trate, lo que como se explica en la introducción, está estrechamente relacionado con la expresión de las diferentes moléculas que median la

adhesión (Springer, 1994; Ager, 1997). En este sentido ya se han reportado diferentes niveles basales de adhesión a endotelio de entre 5% hasta 30% para diferentes subpoblaciones de leucocitos no activados (linfocitos T, PMN, NK y monocitos), niveles que pueden variar en distinta proporción cuando se activa al endotelio dependiendo de la subpoblación de leucocitos de la que se trate (Allavena et al., 1996). En esta misma serie de experimentos también quedó de manifiesto que la adhesión basal (HUVEC sin IL-1 β y PBMC sin PMA) varía dependiendo del individuo del que se hayan obtenido las células y va desde 6% hasta 15% (respecto al total de células marcadas), lo cual ocurre también en los experimentos realizados por Shimizu y cols. (1991), quienes reportan diferencias similares (5%-15%) en la adhesión basal a células endoteliales de linfocitos T CD4+ obtenidos de dos donadores distintos. Por su parte Jonjic y cols. (1992) también reportan valores de adhesión basal dentro de este rango (10%) para monocitos no activados. Esta variabilidad interindividual puede explicarse si se considera que en los seres humanos el número de células de las diferentes subpoblaciones puede variar desde tres (linfocitos) hasta más de diez (monocitos) veces en un ml de sangre, dependiendo del individuo y sobre todo de los diferentes factores a los que esté expuesto, lo que también puede afectar la inmunocompetencia de sus células (Glaser et al., 1990). Finalmente, en estos mismos resultados se mostró que la activación de las células endoteliales con IL-1 β produjo un incremento significativo en la adhesión de las PBMC al endotelio en comparación a la adhesión basal. Este mismo tipo de observación ya se ha reportado para monocitos (Jonjic et al., 1992), linfocitos T CD4+ (Shimizu et al., 1991), linfocitos T y células NK (Allavena et al., 1996). Asimismo la activación con PMA de las PBMC aumentó significativamente su adhesión al endotelio en mayor proporción que la activación sólo del endotelio con IL-1 β , efecto observado también por otros autores (Shimizu et al., 1991).

Considerando todo lo anterior podemos concluir que este ensayo es capaz de reproducir de manera consistente experimentos ya reportados en la literatura, lo cual lo valida como un ensayo confiable para evaluar adhesión de leucocitos a endotelio.

EFFECTO ESTIMULADOR DE PROLACTINA.

Los resultados obtenidos de los experimentos en los que las PBMC de cuatro diferentes individuos fueron incubadas con diferentes concentraciones de PRL de 23 kDa ponen de manifiesto la capacidad de esta hormona/citocina para estimular la adhesión de estas células al endotelio. Las PBMC de tres de los cuatro individuos probados tuvieron aumento significativo de su adhesión a HUVEC en cuando menos una de las concentraciones probadas. Es importante notar que este efecto estimulador se presentó particularmente con concentraciones intermedias de PRL produciéndose así un efecto campana, el cual es más evidente al hacer la curva del efecto promedio de los cuatro individuos (Fig. 13). Por su parte la PRL no tuvo efecto sobre las células del individuo D, sin embargo cabe señalar que la adhesión de las células de este individuo así como las del individuo B en el que el efecto de PRL fue bajo, mostraron una adhesión basal elevada ($>$ a 27 %) en comparación a las células de los otros dos individuos. Con base en esta observación es posible especular que posiblemente la PRL no tuvo un efecto claro sobre las células de estos individuos porque se encontraban pre-activadas por moléculas presentes en el plasma de los individuos. Esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de anticuerpos monoclonales anti-PRL lograron reducir la adhesión de las PBMC a HUVEC. Así pues es posible pensar que el estado inmune de las células del individuo puede ser tal que haya pre-activación de las células ya sea por PRL o algunas otras moléculas presentes en el plasma del individuo.

En apoyo al efecto observado con PRL 23 kDa, el tratamiento de las células con PRL 16kDa, la cual es agonista del receptor a PRL en bioensayos de células Nb2 (Clapp et al., 1988), produjo un efecto estimulador de la adhesión similar al observado con PRL 23 kDa, ya que solamente con concentraciones intermedias de esta molécula se obtuvo un efecto estimulador. En este sentido cabe destacar que las concentraciones empleadas de PRL 16 kDa y 23kDa caen dentro del rango de la Kd conocida para los receptores de esta hormona que va desde 100pM hasta 1 nM dependiendo del isomorfo que se trate. A este

mismo respecto es importante señalar que la forma de campana del efecto observado con ambas prolactinas es coherente con el modelo de dimerización planteado para el receptor a PRL por Fuh y cols. (1993). Según este modelo las curvas esperadas para una respuesta celular a PRL deben presentarse en forma de campana uni o bimodal, esto debido a que con concentraciones intermedias de PRL (de 0.5 nM a 1 μ M) puede inducirse la máxima dimerización del receptor y por ello obtenerse un efecto, mientras que con concentraciones altas (> a 1 μ M) o bajas (< a 0.5 nM) habría una menor dimerización del receptor a PRL y por lo tanto un menor efecto (Fig. 17). Si bien es cierto que en nuestros experimentos la inhibición del efecto por la propia hormona se alcanzó con una concentración menor a la encontrada por Fuh y cols. (1993)(aproximadamente 10nM vs 1 μ M), es importante considerar que los experimentos llevados a cabo por ese grupo se realizaron con células Nb2 que expresan hasta 20 veces más receptores que cualquier subpoblación de PBMC (12,000 vs. 500 receptores/cel.); sin embargo puede verse que una concentración ligeramente mayor a 0.5 nM (12.5 ng/ml) si produjo un efecto en nuestros experimentos lo cual es posible si consideramos que en las células Nb2 el mayor efecto por PRL se alcanza activando sólo el 10% del total de receptores. Con estas consideraciones el tipo de efecto observado en nuestros experimentos que presentan forma de campana y no dosis-respuesta señalan fuertemente hacia la posibilidad de que el aumento en la adhesión se debe a la interacción de PRL con su receptor, el cual se sabe es expresado por diversas poblaciones de leucocitos. Efectos de PRL con esta misma forma se han observado en experimentos de citotoxicidad de células NK (Matera et al., 1991) y de proliferación de células Jurkat con el mismo rango de concentraciones de la hormona (12.5-200 ng/ml)(Matera et al., 1997).

En relación a la magnitud del efecto observado debe señalarse que en los experimentos llevados a cabo con IL-2 y PRL (Fig. 15) se demostró que el incremento producido por PRL fue similar al efecto obtenido con 50 U/ml de IL-2, concentración con la cual se alcanza la mitad de la estimulación máxima para esta citocina (Pankonin et al., 1992). Los resultados obtenidos al tratar con IL-2 y PRL señalan la posibilidad de que ambas citocinas compartan al menos parte de la vía de señalización, pero que la IL-2 es más eficiente para activar dicha vía. Además dado que a mayor concentración de IL-2 hay un

mayor efecto, puede pensarse que la IL-2 no sólo actúa a través de la misma vía que comparte con PRL, sino que además es capaz de activar otras cascadas de transducción de señal que llevan a un aumento en la adhesión. Esta hipótesis explica el porque al emplear ambas citocinas en combinación el efecto observado no fue una suma de los efectos por separado.

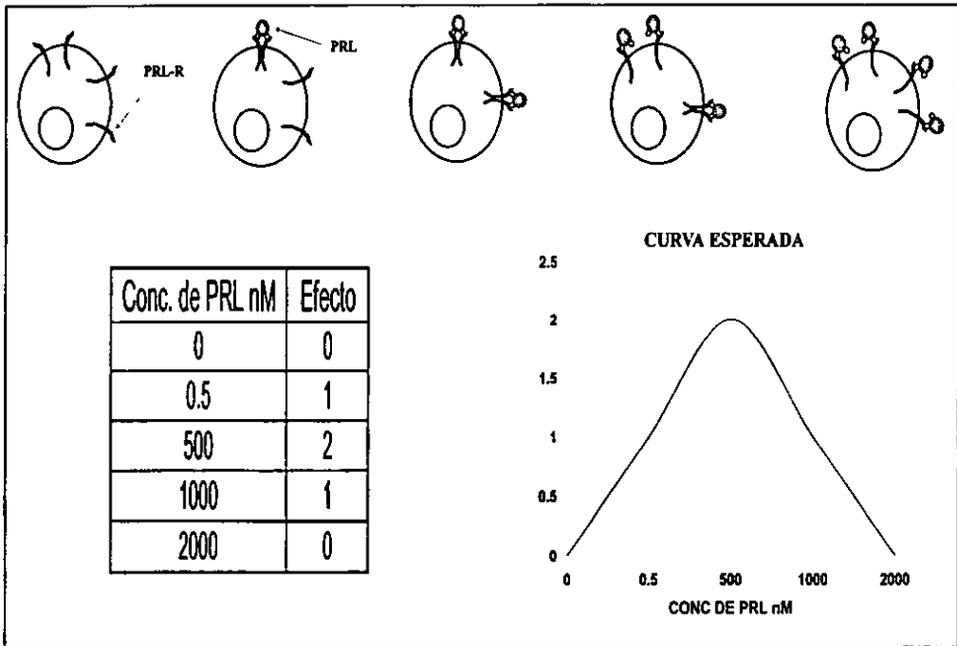


Figura 17. Curva de efecto esperada para la PRL según el modelo de dimerización del receptor. En la parte superior se esquematizan células hipotéticas sometidas a diferentes concentraciones de PRL y la manera en la que se comportarían sus receptores. En la parte inferior izquierda se encuentran la tabla de efectos para cinco concentraciones, tomando a un receptor activo (dimerizado) con un efecto igual a 1. En la parte derecha se presenta la curva esperada del efecto de PRL sobre estas células. Es importante señalar que esta interacción entre la PRL y su receptor es posible ya que la afinidad del receptor por el sitio 1 es mayor a su afinidad por el sitio 2 de la PRL, lo que hace posible el estado representado en el cuarto esquema.

Además la magnitud de los resultados obtenidos en estos experimentos permiten especular sobre la subpoblación de PBMC involucrada en el aumento de la adhesión. Si tomamos en cuenta que el aumento en la adhesión de las PBMC de los individuos fue del 5 al 20 % (Fig. 12) y que los monocitos constituyen aproximadamente el 17 % del total de las PBMC de un individuo, entonces podría especularse que estas células son las que

responden al tratamiento con PRL, ya que los linfocitos B constituyen el 29 % y los linfocitos T más del 50 %. No obstante con estos resultados no es posible descartar que se trate de una subpoblación de linfocitos T o B, o bien de una subpoblación heterogénea de células.

En los resultados obtenidos en los experimentos realizados con anticuerpos monoclonales anti-PRL, capaces de bloquear la unión de PRL a su receptor y por lo tanto de evitar que se activen sus cascadas de señalización, se observó que dichos anticuerpos redujeron la adhesión basal de las PBMC a HUVEC. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la PRL es capaz de regular la adhesión entre estos dos tipos celulares. Además los resultados de este experimento permiten especular sobre el papel que esta hormona producida autócrinamente por las células inmunocompetentes juega en la regulación local de la adhesión entre los leucocitos y el endotelio.

Existen experimentos realizados por otros autores que apoyan directa o indirectamente la hipótesis de un efecto de PRL sobre la adhesión. Se ha encontrado por ejemplo que esta hormona estimula la expresión de la integrina LFA-1 y la selectina-L en células Nb2, provenientes de un linfoma de células T de rata (comunicación personal). Además se han realizado experimentos con células endoteliales de capilar bovino (BBEC) crecidas en geles de colágena tipo I, en los que se ha demostrado como la PRL 16 kDa es capaz de provocar disociación de las estructuras tipo capilar que forman estas células. De acuerdo con estos autores, este resultado sugiere que esta variante de PRL interfiere de manera directa o indirecta con algún tipo de molécula de adhesión relacionada con la forma y organización de las BBEC (Clapp et al., 1993b). Es muy probable que las moléculas de adhesión que intervienen en el mecanismo de disociación de las células sean las integrinas, ya que existen moléculas de esta familia que median tanto al adhesión intercelular como la adhesión a moléculas de matriz extracelular como la colágena (Pigot y Power, 1993). Aunque los resultados obtenidos con las BBEC podrían apoyar la hipótesis de la regulación de integrinas por parte de la PRL, es evidente que en este caso se trataría de una regulación negativa de la adhesividad de estas moléculas, efecto contrario a lo que en este trabajo

hemos detectado, no obstante este hecho no descarta nuestra hipótesis ya que puede tratarse de integrinas diferentes a las que intervienen en la adhesión de leucocitos a endotelio o bien con patrones de regulación distintos.

El mecanismo mediante el cual la PRL podría llevar a cabo la estimulación de la adhesión es posiblemente regulando la adhesividad de las integrinas, moléculas que como ya se explicó son trascendentales en la adhesión y migración de los leucocitos. Esta posibilidad se apoya en que recientemente se ha reportado que la Fosfolipasa C γ (PLC γ) forma parte del grupo de enzimas intracelulares involucradas con la señalización del receptor para PRL (Bole-Feysot et al., 1998). Esto es importante ya que como se explicó anteriormente la PLC puede ser activada por proteínas G de los receptores para quimioattractores, los cuales se sabe juegan un papel importante en la regulación de las integrinas (Springer, 1994). Otro posible mecanismo mediante el cual la PRL puede regular la adhesión de PBMC a HUVEC es mediante la regulación de la Óxido Nítrico sintetasa (NOS), ya que se sabe que el óxido nítrico es capaz de regular la adhesión de leucocitos a endotelio (Mühl y Dinarello, 1997). La NOS se sabe que es regulada por uno de los factores inducibles por el receptor a PRL, el factor-1 regulador del interferon (IRF-1) (Yu-Lee et al., 1998).

Una explicación alternativa para los efectos observados en estos experimentos es que la estimulación de la adhesión se deba a un artefacto provocado por contaminación con endotoxina (EN) en las preparaciones usadas de PRL, esto es posible ya que se trató de PRL humana recombinante. A este respecto Gala y Shevach (1998) presentaron un reporte en el que varios efectos sobre células del Sistema Inmune (secreción de IL-12, TNF α , expresión de CD86 en macrófagos y proliferación estimulada de esplenocitos) que inicialmente se habían asociado a PRL recombinante bovina, en realidad se debían a la presencia de EN en las preparaciones de la hormona, sin embargo es importante señalar que los efectos reportados por Gala y Shevach fueron sigmoidales, lo cual no es de esperarse cuando se trata de un efecto mediado por el receptor a PRL como ya se explicó anteriormente. A esto se suma el hecho de que ya otros autores han reportado que la concentración mínima de EN

para provocar un aumento de la adhesión de monocitos a endotelio es de 10 ng/ml (Doherty et al., 1989), mientras que la concentración mayor de EN en nuestros experimentos fue al menos cinco veces menor evaluada por el ensayo de E-Toxate. Además esto es apoyado por los resultados de Clapp y cols. (1993b) quienes describieron que los efectos de PRL 16kDa recombinante que observaron sobre BBEC no se debían a EN y más aún, que demostraron que con la misma concentración de EN de las preparaciones de PRL no se obtenía efecto sobre la proliferación de estas células. Por todo lo anterior la posibilidad de que el incremento producido por las preparaciones de PRL sean un efecto producido por EN es baja.

Así pues en conjunto estos resultados y consideraciones sugieren que la PRL humana de 23 kDa promueve la adhesión de los leucocitos a EC *in vitro*. Además considerando los resultados de otros autores, sugerimos que este efecto se lleva a cabo mediante la regulación de la expresión o adhesividad de moléculas del tipo de las *integrinas*, lo que es posible que ocurra mediante la vía de la PLC γ o la NOS, que se han asociado a la cascada de señalización del receptor a PRL. No obstante es necesario llevar a cabo experimentos orientados hacia la identificación de los mecanismos mediante los cuales la PRL es capaz de regular la adhesión de los leucocitos al endotelio.

Adicionalmente se deben realizar experimentos que ayuden a descartar por completo la posibilidad de que el efecto observado sea un artefacto provocado por la contaminación de las preparaciones de PRL con endotoxina. En este sentido podría ayudar el uso de polimixina B en los ensayos para inactivar a la EN presente. Otra alternativa es llevar a cabo experimentos de adhesión tratando a las PBMC con concentraciones de EN similares a las presentes en las preparaciones de PRL y evaluar si se producen efectos semejantes a los observados.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados sugieren fuertemente que la PRL participa en la regulación de la adhesión entre los leucocitos y el endotelio, aunque es necesario llevar a cabo experimentos que refuercen la especificidad de los efectos observados. Dado que el mecanismo mediante el cual la PRL podría llevar a cabo este efecto se desconoce, sería interesante realizar experimentos que permitan identificar las moléculas de adhesión así como los mensajeros secundarios involucrados.

Otro aspecto interesante que queda por resolver según los resultados obtenidos es la identificación de las poblaciones de leucocitos que responden a PRL ya que, como se mencionó en la sección anterior, en el conjunto de PBMC podemos encontrar distintos tipos celulares (p. ej. linfocitos B, T y monocitos, etc) los cuales no se adhieren con la misma afinidad al endotelio.

Por último sería interesante llevar a cabo experimentos en los que se analice si la PRL y/o sus variantes moleculares son capaces de regular este mismo proceso de adhesión actuando sobre las células endoteliales.

BIBLIOGRAFÍA

Ager, A. (1997) Transendothelial migration of lymphocytes in vitro; en *Immunology Methods Manual*. Academic Press, Vol.3. San Diego, USA. p.p.1830.

Allavena, P., Bianchi, G., Paganin, C., Giardina, G. y Mantovani, A. (1996) Regulation of adhesion and transendothelial migration of Natural Killer cells. *Nat Immunol* 15: 107-116.

Athreya, B., Zulian, F., Godillot, A. y Williams, W. (1994) Prolactin receptor levels on lymphocytes vary with menstrual cycle in women. *Pathobiology* 62: 34-42.

Ben Jonathan, N., Mershon, J., Allen, D. y Steinmetz, R. (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 17: 639-669.

Berczi, I., Nagy, E., Asa, S. y Kovacs, K. (1983) Pituitary hormones and contact sensitivity in rats. *Allergy* 38: 325-330.

Berczi, I. (1997) Pituitary hormones and immune function. *Acta Paediatr Suppl* 423: 70-75.

Bernton, E., Meltzer, M. y Holaday, J. (1988) Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science* 239: 401-404.

Bianchi, G., Sironi, M., Ghibaudi, F., Selvagini, C., Elices, M., Allavena, P. y Mantovani, A. (1993) Migration of Natural Killer cells across endothelial monolayers. *J Immunol* 151: 5135-5144.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. y Kelly, P. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19: 225-268.

Carrier, M., Russell, D., Wild, J., Emery, R. Y Copeland, J. (1987) Prolactin as a marker of rejection in human heart transplantation. *J Heart Transplant* 6: 290-292.

Cesano A; Oberholtzer E; Contarini M; Geuna M; Bellone G y Matera L. (1994) Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. *Immunopharmacology* 28: 67-75.

Clapp, C., Sears, P., Russell, D., Richards, J., Lavay-Young, B. y Nicoll, C. (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122: 2892-2898.

Clapp, C. y Weiner, R. (1992) A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130: 1380-1386.

Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., Del Río, T. y López F. (1993a) Divergencia funcional de los mensajeros proteínicos. en *Comunicación Neuroendócrina. Bases Celulares y Moleculares*. S.M.C.F. México. p.p.292.

Clapp, C., Martial, J., Guzman, R., Rentierdelrue, F. y Weiner, R. (1993b) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133: 1292-1299.

Clapp, C., López-Gómez, F., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotela, Y., Dueñas, Z., Ochoa, A., Noris, G., Acosta, E., Garay, E. y Martínez de la Escalera, G. (1998) Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol* 156: 1-8.

- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P., Pan, Y., Olander, J., Connolly, T. y Stern, D. (1991) Vascular Permeability Factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535-1545.
- Clevenger, C., Russell, D., Appasamy, P. y Prystowsky, M. (1990) Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87: 6460-6464.
- Clevenger, C., Sillman, A., Hanley-Hyde, J. y Prystowsky, M. (1992) Requirement for prolactin during cell cycle regulated gene expression in cloned T-lymphocytes. *Endocrinology* 130: 3216-3222.
- Dardenne, M., Leitte-de-Moraes, M., Kelly, P. y Gagnerault, M. (1994) Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. *Endocrinology* 134: 2108-2114.
- de Mello-Cohello, V., Serra, D., Dardenne, M. y Savino, W. (1996) Pituitary hormones regulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 76: 39-49.
- Doherty, D., Zagarella, I., Henson, P. y Worthen, G. (1989) Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both monocyte and the endothelial cell. *J Immunol* 143: 3673-3679.
- Dhawan, S., Weeks, B., Soderland, C., Shnaper, W., Toro, L., Asthana, S., Hewlitt, Y., Stetler-Stevenson, W., Yamada, S., Yamada, K. y Meltzer, M. (1995) HIV-1 infection alters monocyte interactions with human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 154: 422-432.
- diMattia, G., Gellersen, B., Bohner, H. y Friesen, H. (1988) A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 122: 2508-2517.
- diMattia, G., Gellersen, B., Duckworth, M. y Friesen, H. (1990) Human prolactin gene expression. *J Biol Chem* 265: 16412-16421.
- Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A., Gutierrez-Ospina, G., Barrios, F., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1998) Effects of 16 kDa Prolactin and of Prolactin antibodies on *in vitro* Angiogenesis. *ENDO* 1998
- Dustin, M. y Springer, T. (1991) Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 27-66.
- Ferrag, F., Lebrum, J., Touraine, P., Nagano, M., Dardenne, M. y Kelly, P. (1994) Prolactin and the immune system. *Immunomethods* 5: 21-30.
- Fuh, G., Colosi, P., Wood, W. y Wells, J. (1993) Mechanism-based design of prolactin receptor antagonists. *J Biol Chem* 268: 5376-5381 .
- Gao, J e Issekutz, A. (1996) Expression of VCAM-1 and VLA-4 dependent T-lymphocyte adhesion to dermal fibroblasts stimulated with proinflammatory cytokines. *Immunology* 89: 375-383.
- Gala, R. (1991) Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 198: 513-527.
- Gala, R. y Shevach, E. (1994) Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages. *Proc. Soc. Exp Biol Med* 205: 12-19.
- Gala, R. y Shevach, E. (1998) The immunomodulatory effects of a recombinant bovine prolactin (rbPRL) are secondary to endotoxin contamination. *ENDO* 1998.
- Gellersen, B., Bonhoff, A., Hunt, N. y Bohner, H. (1991) Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology* 129: 158-168.

- Gerli, R., Rambotti, P., Nicoletti, I., Orlandi, S., Migliorati, G. y Riccardi, C. (1986) Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clin Exp Immunol* 64: 399-406.
- Ginsburg, E. y Vonderhaar, B. (1995) Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* 55, 2591-2595.
- Glaser, R., Kennedy, S., Lafuse, W., Bonneau, R., Speicher, C., Hillhouse, J. y Kiecolt-Glaser, J. (1990) Psychological stress- induced modulation of interleukin-2 receptor gene expression and interleukin-2 production in peripheral blood leukocytes. *Arch Gen Psychiatry* 47: 707-712.
- Guinan, E., Smith, B., Doukas, J., Miller, R. y Pober, J. (1989) Vascular endothelial cells enhance T cell responses by markedly augmenting IL-2 concentrations. *Cell Immunol* 118: 166-177.
- Hartmann, D., Holaday, J. y Bernton, E. (1989) Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB* 3: 2194-2202.
- Hatfill, s., Kirby, R., Hanley, M., Rybicki, E. y Bohm, L. (1990) Hyperprolactinemia in acute myeloid leukemia and indication of ectopic expression of human prolactin in blast cells of a patient of subtype M4. *Leuk Res* 14: 57-62.
- Hiestand, P., Mekler, P., Nordmann, R., Grieder, A. y Permmongkol, C. (1986) Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2599-2603.
- Hughes, C., Savage, C. y Pober, J. (1990a) The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Immunol Rev* 117: 85-102.
- Hughes, C., Savage, C. y Pober, J. (1990b) Endothelial cells augment T cell interleukin 2 production by a contact-dependent mechanism involving CD2/LFA-3 interaction. *J Exp Med* 171: 1453-1467.
- Jain, R., Koenig, G., Dellian, M., Fukumura, D., Munn, L. y Melder, R. (1996) Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Can Met Reviews* 15: 195-204.
- Johnston, S., Dustin, M. Hibbs, M. y Springer, T. (1990) On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules. *J Immunol* 145: 1181-1187.
- Jonjic, N., Jilek, P., Bernasconi, S., Peri, G., Padura, M., Cenzuales, S., Dejana, E. y Mantovani, A. (1992) Molecules involved in the adhesion and cytotoxicity of activated monocytes on endothelial cells. *J Immunol* 148: 2080-83.
- Kooijman, R., Hooghe-Peters, E. y Hooghe R. (1996) Prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the Immune System. *Adv Immunol* 63: 377-353.
- Krumenacker, (1998) Signaling cross talk between prolactin and T-cell antigen receptors. *ENDO* 1988.
- Larson, D., Copeland, J. y Russell, D. (1985) Prolactin predicts cardiac allograft rejection in cyclosporin immunosuppressed patients. *Lancet* 2: 8445-8453
- Lavalle, C., Loyo, E., Paniagua, R., Bermudez, J., Herrera, J., Graef, A., Gonzalez-Barcelona, D. y Fraga, A. (1987) Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus *J Rheumatol* 14: 268-272.
- Leitte-de-Moraes, M., Touraine, P., Kelly, P., Kuttann, F. y Dardenne, M. (1995) Prolactin receptor expression in lymphocytes from patients with hyperprolactinemia or acromegaly. *J Endocrinol* 147: 353-359.

- Lloyd, A., Oppenheim, J., Kelvin, D. y Taub, D. (1996) Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 156: 932-938.
- Mantovani, A., Bussolino, F y Dejana, E. (1992) Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB* 6: 2591-2599.
- Matera, L., Cesano, A., Veglia, f. y Muccioli, G. (1990) Effect of prolactin on human natural killer cell activity. En *Neuropeptides and Immunopeptides: Messengers in a Neuroimmune Axis*. Vol 549 del *Annals of the New York Academy of Sciences*. 396-398 p.p.
- Matera, L., Bellone, G. y Cesano, A. (1991) Prolactin and the neuroimmune network. *Adv Neuroimmunol* 1: 158-172.
- Matera, L., Cesano, A., Bellone, G. y Oberholtzer, E. (1992) Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 6: 409-417.
- Matera, L. (1997) Prolactin is an autocrine growth factor for the Jurkat human T-leukemic cell line. *J Neuroimmunol* 79: 12-21.
- Mier, J., Brandon, E., Libby, P., Janicka, M. y Aronson, F. (1989) Activated endothelial cells resist lymphokine- activated killer cell-mediated injury. *J Immunol* 143: 2407-2414.
- Mitra, I. (1980) A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1750-1759.
- Montgomery, D., Zukoski, C., Shah, G., Buckley, A., Pacholczyk, T. y Russel, D. (1987) Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Bioch Bioph Res Communications* 145: 692-698.
- Montgomery, D., Shan, G., Ulrich, E., Steiner, L., Parrish, P. y Zukoski, C. (1992) Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 131: 3019-3026.
- Montgomery, D., Krumenacker, J. y Buckley, A. (1998) Prolactin stimulates phosphorylation of the human T-cell antigen receptor complex and ZAP-70 tyrosine kinase: a potential mechanism for its immunomodulation. *Endocrinology* 139: 811-814.
- Mühl, H. y Dinarello, C. (1997) Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulates human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. *J Immunol* 159: 5063-5069.
- Murphy, W., Hallgeir, R. y Longo, D. (1995) Effects of growth hormone and prolactin. *Immune development and function*. *Life Sciences* 57: 1-14.
- Nagy, E. y Berczi, I. (1989) Pituitary dependence of bone marrow function. *Br J Haematol* 71: 457-462.
- Nagy, E., Berczi, I., Wren, G., Asa, S. y Kovacs, K. (1983a) Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 6: 231-243.
- Nagy, E., Berczi, I. y Friesen, H., (1983b) Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 102: 351-357.
- Ohkubo, C., Bigos, D. y Jain, R. (1991) Interleukin 2 induced leukocyte adhesion to the normal and tumor microvascular endothelium in vivo and its inhibition by dextran sulfate: implications for vascular leak syndrome. *Cancer Res* 51: 1561-1563.

Pakonin, G., Reiprt, B. y Ager, A. (1992) Interactions between interleukin-2 activated lymphocytes and vascular endothelium: binding to and migration across specialized and non-specialized endothelia. *Immunology* 77: 51-60.

Pellegrini, I., Lebrun, J., Ali, S. y Kelly, P. (1992) Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol. Endocrinology* 6: 1023-1031.

Pierpaoli, W. (1967) Thymectomy and the prolongation of tolerance to bovine serum albumin in adult rats. *Nature* 214: 802-803.

Pierpaoli, W. y Sorkin, E. (1968) Effect of gonadectomy on the peripheral lymphatic tissue of neonatally thymectomized mice. *Br J Exp Pathol* 49: 288-93.

Pigott, R y Power, C. (1993) The adhesion molecule. Facts Book. Academic Press, San Diego, USA. p.p. 190.

Postel-Vinay, M. (1996) Growth hormone and prolactin binding proteins: soluble forms of receptors. *Horm Res* 45: 178-181.

Prystowsky, M. y Clevenger, C. (1994) Prolactin as a second messenger for interleukin-2. *Immunomethods* 5: 49-55.

Riddle, O., Bates, R. y Dykshorn, S. (1932) A new hormone of the anterior pituitary. *Proc Soc Exp Biol Med* 29: 1211-1215.

Roitt, I., Brostoff, J., y Male, D. (1996) *Immunology*. Ed. Mosby, Barcelona, España. pp. 420.

Russell, D., Mills, K., Talamantes, F. y Bern, H. (1988) Neonatal administration of prolactin antiserum alters the developmental pattern of T- and B-lymphocytes in the thymus and spleen of BALB/c female mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85: 7404-7407.

Russel, D. (1988b) Prolactin and Immunomodulation en Prolactin gene family and its receptors. Elsevier Science Publishers 155-165 p.p.

Sabharwal, P., Glaser, R., Lafuse, W., Varma, S., Liu, Q., Arkins, S., Kooijman, R., Kutz, L., Kelley, K. y Malarkey, W. (1992) Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci* 89: 7713-7716.

Schreiner, A. y Hopen, G. (1979) Adhesion and locomotion of human leukocytes in vitro; importance of protein coating; effect of lidocain, ethanol and endotoxin. *Acta Pathol Microbiol Scan* 87: 333-340.

Sercarz, E. y Datta, S. (1994) Mechanisms of autoimmunization: perspective from the mid-90s. *Curr Opin Immunol* 6: 875-881.

Shimizu, Y., Newman, W., Gopal, V., Horgan, K., Graber, N., Beal, D., Seventer, G. y Shaw, S. (1991) Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* 113: 1203-1212.

Sinha, Y. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev* 16: 354-369.

Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. Y Mantovani, A. (1989) IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 142:549.

- Spangelo, B., Judd, A., Isakson, P. y MacLeod, R. (1989) Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 125: 575-577.
- Springer, T. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.
- Stoolman, L. (1989) Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 56: 907-910.
- Swain, S. (1991) Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 3: 304-310.
- Valliant, P., Martinet, N. y Martinet Y. (1993) Synergic *in vitro* effects of Interleukin-2 and τ -interferon on the migration of blood monocytes from control subjects and patients with lung cancer. *Cancer* 72: 2141-2147.
- Van Severter, G., Shimizu, Y., Horgan, K. y Shaw, S. (1990) The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144: 4579-4586.
- Vidaller, A., Llorente, L., Larrea, F., Mendez, J., Alcocer-Varela, J. y Alarcon-Segovia, D. (1986) T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: effect of bromocriptine treatment. *Clin Immunol Immunopathol* 38: 337-343.
- Yu-Lee, L. (1997) Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 35-51.
- Yu-Lee, L., Luo, G., Book, M. y Morris, S. (1998) Lactogenic hormone signal transduction. *Biology Reproduction* 58: 295-301.
- Wu, H., Devi, R. y Malarkek, W. (1996) Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* 137: 349-353.