



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“Participación de la prolactina y su receptor en la apoptosis de una línea celular de linfocitos B inmaduros”

**T E S I S**

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

**PRESENTA:**

**LUIS CARLOS ZUMAYA PÉREZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Profesor: Enrique Ortega Soto  
**VOCAL:** Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría  
**SECRETARIO:** Profesor: Rocío Flores Fernández  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Julio César Martínez Álvarez  
**2º SUPLENTE:** Profesor: Octavio Escamilla Castro

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

**M en C. Rocío Flores Fernández**

### **SUSTENTANTE:**

---

**Luis Carlos Zumaya Pérez**

<b>ÍNDICE</b>	<b>pág.</b>
Índice de figuras.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación e Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
Material y métodos.....	13
Diagrama de flujo.....	15
Resultados.....	16
Discusión.....	22
Conclusiones.....	25
Referencias.....	26
Anexo.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Maduración y diferenciación del linfocito B.....	3
Figura 2. Mecanismos de tolerancia del linfocito B.....	4
Figura 3. Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231.....	5
Figura 4. Estructura de la prolactina.....	6
Figura 5. Receptor de prolactina.....	8
Figura 6. Vías de señalización activadas por la PRL a través de su receptor.....	9
Figura 7. Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231.....	16
Figura 8. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por Anexina V.....	17
Figura 9. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3.....	18
Figura 10. Efecto de la PRL en la activación de STAT-1 en células WEHI-231.....	19
Figura 11. Efecto de la PRL en la activación de STAT-3 en células WEHI-231.....	19
Figura 12. Efecto de la PRL en la activación de STAT-5 en células WEHI-231.....	20
Figura 13. Efecto de la PRL en la activación de AKT en células WEHI-231.....	21
Figura 14. Efecto de la PRL en la activación de ERK1/2 en células WEHI-231.....	21

## ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
c-myc	Gen miembro de la familia de proto-oncogenes MYC
HSC	Célula troncal Hematopoyética
ELP	Progenitor linfoide temprano
CLP	Progenitor linfoide común
Bax	Del inglés, bcl-2-like protein 4
Bcl- 2	Del inglés, B-cell lymphoma 2
Bcl-6	Del inglés, B-cell CLL/lymphoma 6
Bcl-xl	Del inglés, B-cell lymphoma-extra large
BCR	Receptor de linfocito B
Blimp-1	Del inglés, B lymphocyte-induced maturation protein-1
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Molécula de diferenciación
EA2	Del inglés, single-stranded DNA-binding protein
EBF	Del inglés, early B-cell factor
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FACS	Citometría de flujo (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
Fas	Molécula de superficie Fas (CD95)
FasL	Ligando de Fas

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXO1	Del inglés, forkhead box O1
Ig's	Inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de la inmunoglobulina
IgL	Cadena ligera de la inmunoglobulina
Ikaros	Del inglés, zinc finger transcription factors
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IRF-1	Factor regulador de interferón-1
IRF-4	Factor regulador de interferón-4
IRF-8	Factor regulador de interferón-1
JAK2	Janus cinasa 2
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
p53	Proteína supresora de tumores
Pax5	Del inglés, paired box 5
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PRL	Prolactina

Pro-B	Linfocito pro-B
Pre-B	Linfocito pre-B
Pre-BCR	Receptor de linfocito pre-B
PU.1	Del inglés, Spi-1 proto-oncogene
RAG1	Recombinasa 1
RAG2	Recombinasa 2
SNC	Sistema nervioso central
Src	Del inglés, stored response chain
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TNFa	Factor de necrosis tumoral alfa
NK	Célula asesina natural

## RESUMEN

**Introducción.** La ontogenia del linfocito B se inicia en medula ósea, donde las células precursoras pasan por distintos estadios de maduración hasta linfocito B inmaduro, en este estadio las clonas auto-reactivas son eliminadas por mecanismos de tolerancia central como la edición del receptor o muerte por apoptosis. Se ha demostrado que el receptor de PRL se encuentra expresado en linfocitos B. La línea celular WEHI-231 que presenta un fenotipo de linfocito B inmaduro tiene como característica que al entrecruzar el BCR se induce muerte por apoptosis. Ha sido ampliamente usada como modelo para el estudio de la tolerancia; en estas células se demostró la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL y, al incubarlas con esta hormona se encontró un incremento en la sobrevivencia de estas células. La prolactina (PRL) es una proteína globular compuesta por 199 aminoácidos. Esta hormona es producida por las células de la hipófisis anterior y de manera extra-hipofisaria en células del sistema inmune como linfocitos T y B entre otras. El receptor de PRL pertenece a la familia de receptores de citocinas tipo I. En ratón se han descrito cuatro isoformas del receptor (una larga y tres cortas). La unión de la PRL con su receptor induce la dimerización del mismo, iniciando la cascada de señalización, la cual activa las vías de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT. **Objetivo.** Determinar la participación de la prolactina y su receptor en la apoptosis, así como las vías de señalización inducidas por la PRL en una línea celular de linfocito B inmaduro. **Metodología.** Las células WEHI-231 se incubaron con PRL durante una hora y posteriormente se entrecruzó el BCR con fragmentos anti-IgM F(ab)<sub>2</sub>; después de 48 horas se determinó la apoptosis mediante el marcaje con Anexina V y caspasa-3 por citometría de flujo. Además, se determinó la expresión de las proteínas fosforiladas STAT-1, STAT-3, STAT-5, AKT y ERK1/2 mediante citometría de flujo en las células estimuladas con y sin PRL. **Resultados.** Se encontró una disminución en el porcentaje de células Anexina V y caspasa-3 positivas después de incubar una hora con PRL y con anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> en comparación con las células estimuladas solo con anti-IgM F(ab)<sub>2</sub>. También demostramos que la unión de la PRL a su receptor promueve la activación de las moléculas STAT-1, STAT-3, AKT y ERK1/2 en las células WEHI-231. **Conclusiones.** La PRL rescata de la apoptosis inducida por entrecruzamiento del BCR a las células WEHI-231; a través de la isoforma larga del receptor de PRL, activando las vías de señalización JAK-STAT-3, PI3K-AKT y MAPK.

# INTRODUCCIÓN

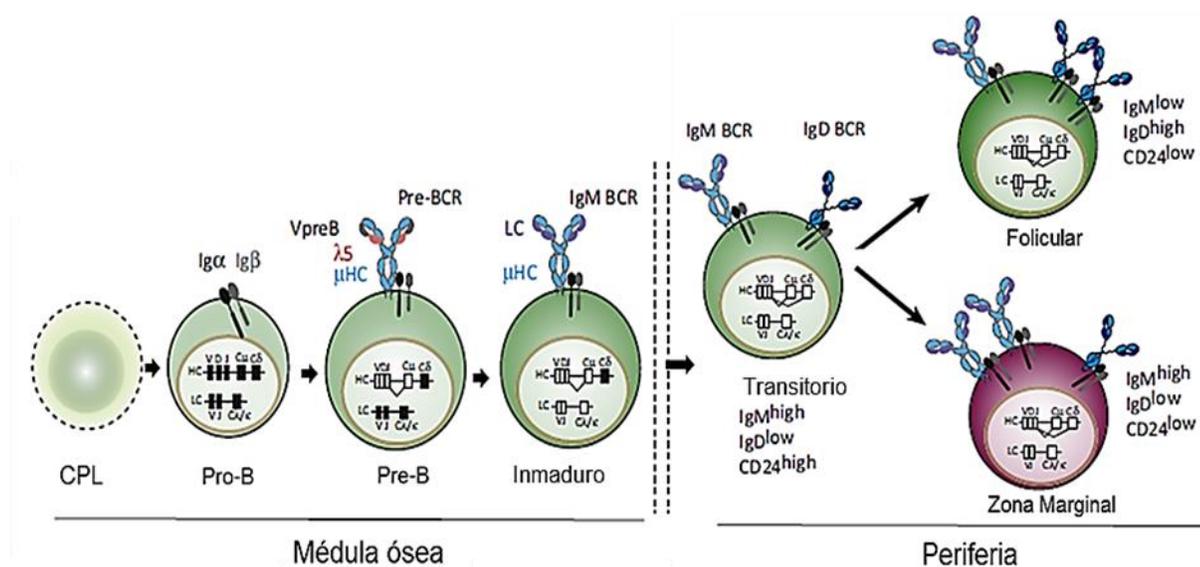
## MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO B

En médula ósea las células madres hematopoyéticas (HSC) se diferencian al progenitor linfoide temprano (ELP) que da lugar al progenitor linfoide común (CLP), los linfocitos B surgen a partir de estos progenitores que también pueden dar origen a linfocitos T y células NK (1,2). Este proceso de maduración requiere de diferentes señales y factores de transcripción (PU.1, Ikaros, E2A, EBF, FOXO1 Pax5, Bcl-6, Blimp-1, IRF4, IRF8) que en conjunto reclutan proteínas que activan genes del linaje B o reprimen genes asociados a otros linajes (3,4).

Los distintos estadios de maduración del linfocito B en médula ósea se pueden diferenciar por la expresión de moléculas de superficie (fenotipo) y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y ligera (IgL) (5,6). Ambas cadenas están formadas por regiones variables y constantes; la región variable de IgH está formada por los segmentos que son codificados por los genes VDJ, mientras que la IgL se genera a partir de los genes VJ. A este proceso se le conoce como recombinación V(D)J y es mediado por las proteínas RAG1/RAG2 (7).

El primer estadio en el linaje del linfocito B es el pro-B, se caracteriza por presentar un fenotipo B220+CD93+IgM-CD43+CD25-CD23- y por la recombinación del fragmento variable de IgH. La primera recombinación de IgH en pro-B se da entre los fragmentos DH y JH (DHJH), seguida de la recombinación del fragmento VH con DHJH, posteriormente se une la parte constante ( $\mu$ ) por un mecanismo de "splicing" alternativo. Cuando IgH ha sido exitosamente expresada, se asocia con las proteínas de señalización Ig $\alpha$  (CD79a) e Ig $\beta$  (CD79b) y la cadena ligera subrogada formada por  $\lambda$ 5 y Vpre-B, generando el receptor de antígeno del linfocito pre-B (pre-BCR) que marca la última fase del linfocito pro-B. La expresión en superficie del pre-BCR indica que la recombinación de genes de la cadena IgH se ha realizado correctamente y regula el proceso de selección positiva de linfocito pro-B a pre-B (5,6).

Los linfocitos pre-B tienen un fenotipo B220+CD93+IgM-CD43-CD25+CD23-. En este estadio la señalización del pre-BCR junto con la del receptor de IL7 inducen la proliferación de los linfocitos pre-B que sirve para aumentar el número de células que ya han tenido éxito en la recombinación de la cadena IgH. Los cuales se diferencian hacia linfocitos pre-B “pequeños” en donde se lleva la recombinación de genes de la cadena IgL, paso importante para continuar con la diferenciación del linfocito B. Al recombinarse exitosamente IgL se une a IgH (cadena  $\mu$ ) más la subunidad de señalización (Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ ) para formar el BCR (isotipo IgM) que se expresa en la superficie celular, lo que da lugar a la selección positiva del linfocito pre-B al estadio inmaduro (B220+CD93+IgM+CD43- CD25-CD23-), último punto de control en la linfopoyesis de B en medula ósea (5,6). Los linfocitos B inmaduros salen a la periferia y migran a bazo para terminar su maduración convirtiéndose en linfocitos B maduros (foliculares o de zona marginal) (Figura 1)

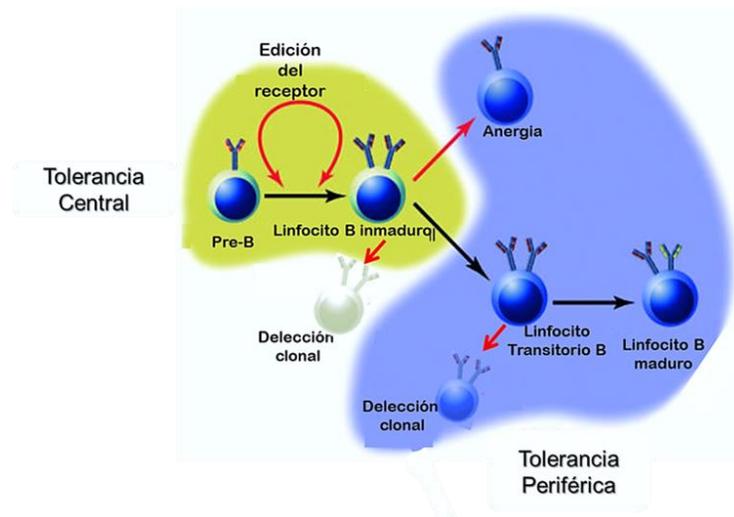


**Figura 1. Maduración y diferenciación del linfocito B.** Durante el proceso de desarrollo y maduración del linfocito B se pueden identificar diversos estadios de maduración por marcadores de superficie y por el rearreglo de genes de Igs (2).

## TOLERANCIA DEL LINFOCITO B

A lo largo del proceso de ontogenia del linfocito B, existen diversos puntos de control que tienen como finalidad mantener la tolerancia, siendo esta el conjunto de mecanismos que se encargan de la eliminación de las clonas auto-reactivas. Se clasifica en tolerancia central y periférica; la primera ocurre en órganos linfoides primarios, mientras que la segunda en órganos linfoides secundarios (8,9)

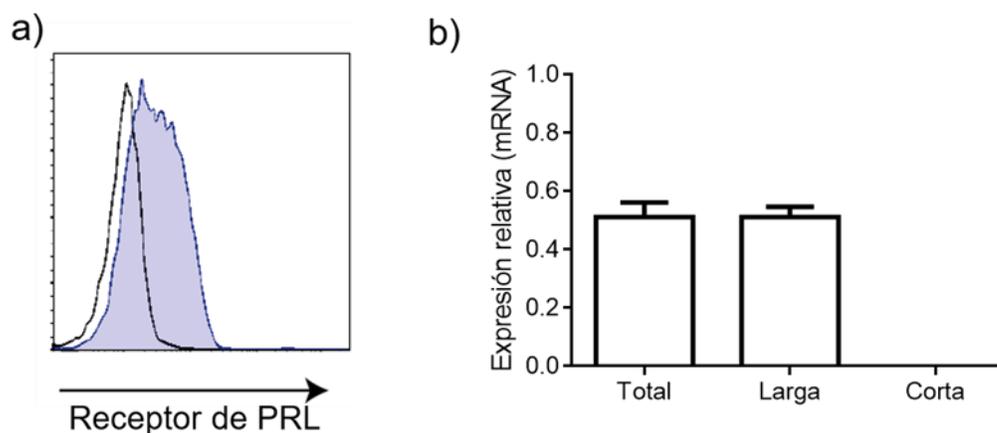
Se estima que el 75% de las células B inmaduras en médula ósea son autoreactivas y que alrededor de un tercio de estas células son eliminadas mediante la edición del receptor que consiste en cambiar la especificidad del dominio variable de la cadena IgL, con lo cual el BCR auto-reactivo es remplazado por un BCR no auto-reactivo (10,11). Además de la edición del receptor, otro mecanismo que contribuye a la eliminación de clonas autoreactivas es la deleción clonal, en donde las células B inmaduras que reconocen con alta afinidad antígenos propios son eliminadas por apoptosis (12,13). Las células auto-reactivas que logran continuar su desarrollo en órganos linfoides secundarios son sometidas a los mecanismos de deleción clonal y anergia, en esta última, los linfocitos B autoreactivos son capaces de reconocer antígenos a través de su BCR pero no reciben señales secundarias para su activación, es decir, no tienen capacidad para responder (14) (Figura 2).



**Figura 2. Mecanismos de tolerancia del linfocito B.** En médula ósea se lleva a cabo la tolerancia central, la cual puede ser edición del receptor o deleción clonal. Cuando el linfocito B sale de médula ósea, sucede la tolerancia periférica, esta consiste en la inducción de anergia o en la deleción clonal (8).

Para entender el proceso de delección clonal en linfocitos B se han utilizado como modelo in vitro líneas celulares provenientes de linfoma como las células CH31 y WEHI-231(15,16). La línea celular WEHI-231 proviene de células B de linfoma de ratones (BALB/c x NZB) F1 y es clasificada como una línea de linfocitos B inmaduro debido al fenotipo que presenta ( $IgM^+$ ,  $IgD^-$ ,  $FcR^{low}$ ,  $Fas^{low}$ , MHC clase II). Al entrecruzar el BCR de las células WEHI-231 con fragmentos anti-IgM F(ab)'2 se genera una respuesta análoga a la delección clonal producida por el reconocimiento de antígenos propios con alta afinidad, haciendo que las células se detengan en la fase G1 del ciclo celular y posteriormente mueran por apoptosis (17). Durante este proceso se ha reportado que, al igual que en linfocitos B inmaduros, en las células WEHI-231 intervienen diversas moléculas relacionadas con la apoptosis como c-myc, p53, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, Fas-FasL para su regulación (18,19).

Además, se demostró que las células WEHI-231 expresan la isoforma larga del receptor de PRL y que esta hormona promueve la sobrevivencia de estas células después de entrecruzar el BCR (20) (Figura 3).



**Figura 3. Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231.** Se muestra la expresión del receptor de PRL en las células WEHI-231; a) a nivel de proteína y b) a nivel de mRNA. (20)

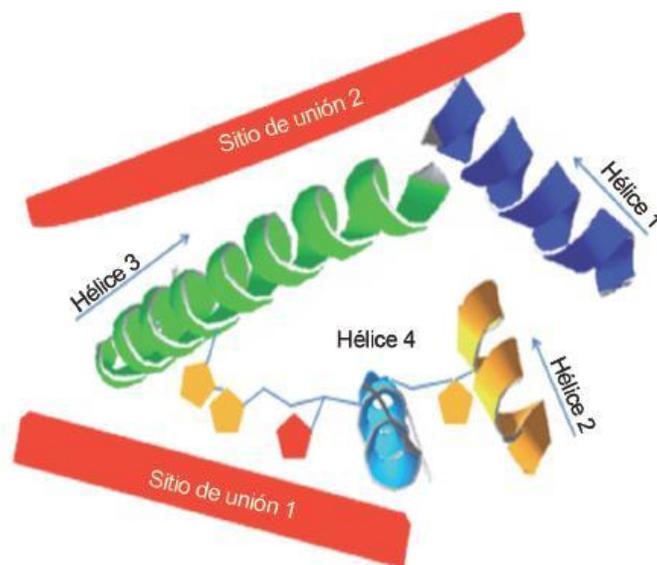
La falla en la eliminación de clones autoreactivos en conjunto con otros factores contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES). Se desconoce la etiología de LES, se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, ambientales, hormonales, inmunológicos y epigenéticos tienen un papel

importante en el desarrollo de la enfermedad. Afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer: hombre de 9:1) entre la pubertad y la menopausia, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas, como la prolactina (PRL) (21,22).

## PROLACTINA

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica que es sintetizada y secretada por células especializadas de la hipófisis anterior llamadas lactotrofos y de manera extrahipofisiaria por diversos tipos celulares como: epitelio mamario, fibroblastos, linfocitos T y B, entre otros (23).

Con base a sus características genéticas, estructurales y funcionales, la PRL pertenece a la misma familia de la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario, las cuales provienen de un mismo gen ancestral. El gen que codifica para la PRL en el humano se localiza en el cromosoma 6 y en el cromosoma 13 en el ratón (24). Esta hormona es una proteína globular compuesta de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intracatenarios, la cual forma una estructura tridimensional de 4  $\alpha$ -hélices antiparalelas (Figura 4).



**Figura 4. Estructura de la prolactina.** La prolactina es una hormona polipeptídica de 199 aminoácidos, con una estructura terciaria de 4  $\alpha$ -hélices antiparalelas, con dos sitios de unión al receptor. (25)

Existen diferentes isoformas de la PRL; la principal tiene un peso molecular de 23 kDa y está presente en hipófisis y suero. Se han descrito otras isoformas como la glicosilada (25 kDa) con menor actividad biológica, una pequeña de 16 kDa implicada en el proceso de angiogénesis, estas variantes de igual manera se unen al receptor de PRL solo que con una menor afinidad en comparación con la PRL de 23 kDa; por su parte la macroprolactina que puede estar constituida por dímeros y/o polímeros de la misma hormona o por la unión con otras proteínas como los anticuerpos (150 kDa) tiene importancia en estudios clínicos para la detección y diagnóstico diferencial de diferentes prolactinemias. La PRL puede actuar de manera endocrina, parácrina o autócrina (23-26).

Su liberación es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tirotrópina, péptido intestinal vasoactivo y por diferentes fármacos como la domperidona y metoclopramida. La inhibición de la secreción de PRL es mediada por dopamina y por sus agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina (23-27).

Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales se pueden clasificar en cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) crecimiento y desarrollo, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunoregulación, cada una de estas funciones dependerá del tipo celular en donde se exprese su receptor (23,24,27).

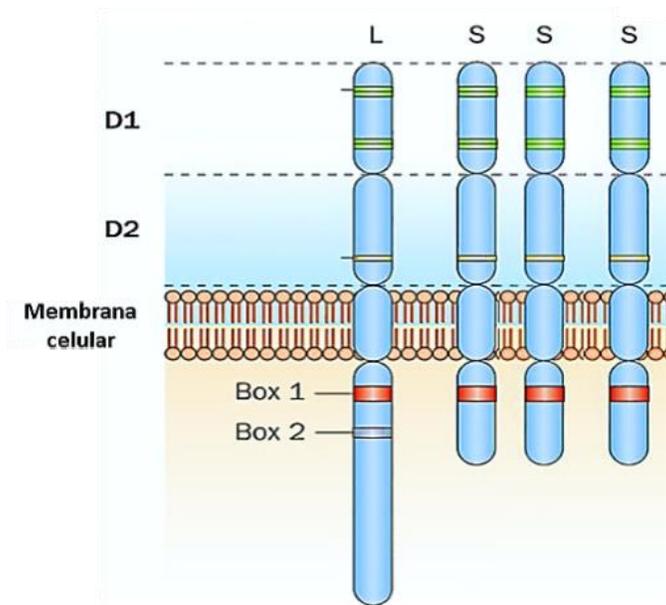
## **RECEPTOR DE PRL**

Los efectos biológicos de la PRL son mediados por la interacción con su receptor, el cual pertenece a la familia de receptores de citocinas tipo I dentro de la que se encuentran el receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el receptor para la eritropoyetina y el receptor para la interleucina 2 (IL-2), entre otras. El receptor de PRL se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B (23,24).

El receptor de PRL consta de tres regiones: extracelular que permite la unión al ligando, transmembranal e intracelular. Esta última región se caracteriza por la presencia de motivos de triptófano y serina; además de dos regiones conservadas conocidas como box1 y box2. A

la región box1 se une constitutivamente a JAK-2, lo cual permite la señalización del receptor (23, 24,27).

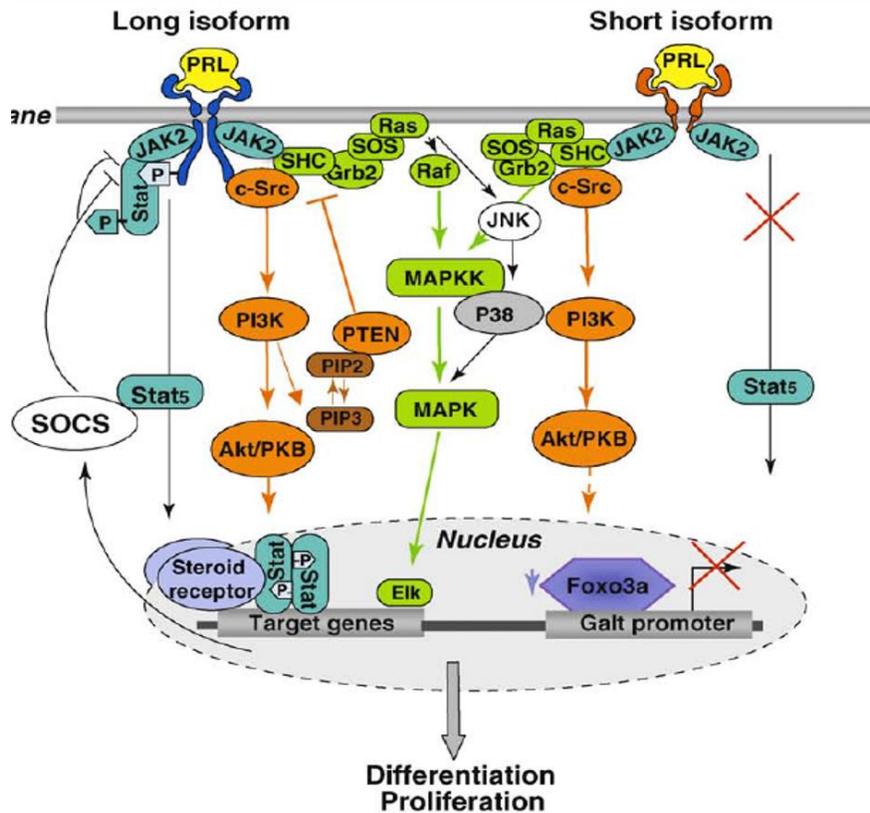
Se han descrito diversas isoformas del receptor de PRL tanto en humano como en ratón las cuales se generan mediante “splicing” alternativo. En humanos se han identificado 7 isoformas del receptor, mientras que en el ratón se conocen 4 isoformas del receptor (una larga y tres cortas) las cuales son idénticas en la región extracelular, pero difieren en tamaño y composición de la región intracelular (Figura 5) (28,29).



**Figura 5. Receptor de prolactina.** En ratón se han descrito 4 isoformas idénticas en la región extracelular y difieren en tamaño y composición de la región intracelular. (24)

La señalización inicia cuando una molécula de PRL se une a dos monómeros del receptor de PRL para inducir su dimerización y subsecuente activación. El receptor de PRL no tiene actividad intrínseca de tirosina-cinasa, pero en su dominio intracelular presenta tirosinas que son fosforiladas por cinasas que son reclutadas al activarse el receptor y que tiene como consecuencia la activación de las vías de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT, las cuales inducen diferenciación, proliferación y supervivencia. La isoforma larga es capaz de señalizar a través de las tres vías de señalización antes mencionadas, mientras que la isoforma corta solo puede señalizar vía MAPK y PI3K-AKT. Esta diferencia se debe a la

ausencia de box2 en las isoformas cortas, el cual es el sitio de unión para STAT. (Figura 6) (27-29).



**Figura 6. Vías de señalización activadas por la PRL a través de su receptor.** Las vías principales que sigue el receptor de PRL son JAK-STAT, PI3K-AKT y MAPK, las cuales tienen efectos en activar genes de diferenciación, proliferación y supervivencia. (29)

Tanto en el humano como en el ratón las isoformas del receptor de PRL se expresan de manera diferencial en diversos tejidos, lo que sugiere efectos distintos en cada tipo celular. En células endoteliales la PRL, a través de la unión a su receptor, activa las vías de señalización JAK-STAT-5 y ERK1/2 promoviendo angiogénesis (30). En glándula mamaria la PRL promueve proliferación, diferenciación y supervivencia a través de la señalización JAK-STAT-5 y PI3K-AKT (31). En testículos la unión de la PRL a su receptor promueve la activación de las vías JAK-STAT-5 y MAPK (32). En células de endometrio, la PRL es capaz de activar a JAK2 y a los STAT-1 y STAT-5 (33). Mientras que en células del sistema inmune como células NK, la PRL induce la activación de la vía MAPK y en células Nb2 activa la vía JAK-STAT (34,35).

## PROLACTINA Y SU RECEPTOR EN EL SISTEMA INMUNE

La relación entre PRL y el sistema inmune se hizo evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (36). Posteriormente en 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina (37). Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL a través de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  que actúan como reguladores parácrinos o endócrinos en la liberación o inhibición de PRL hipofisiaria (38,39). La estimulación *in vitro* con PRL regula el proceso de maduración de timocitos dobles negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) a dobles positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2 (40).

En ratones con trasplante de médula ósea, la administración de PRL recombinante induce un incremento en la linfopoyesis (41). En ratones “knock out” para PRL y su receptor no se encuentran defectos en la producción de los linfocitos a pesar de que el número absoluto de los linfocitos B y sus precursores estén ligeramente disminuidos. Estos resultados muestran que la PRL participa en el proceso de linfopoyesis. Sin embargo, su ausencia no es crítica y su participación en este proceso puede ser sustituida por otros factores redundantes (42-43).

En linfocitos pro-B de ratones transfectados con el receptor, la PRL aumenta la diferenciación hacia linfocitos pre-B (44). Además, la PRL también promueve la proliferación de estas células mediante la activación de cinasas de la familia Src (45).

## **JUSTIFICACIÓN**

El proceso de maduración y diferenciación del linfocito B es altamente controlado para la eliminación de clonas autoreactivas. En médula ósea se elimina el mayor porcentaje de estas clonas mediante los mecanismos de edición del receptor y delección clonal. Este último mecanismo induce la muerte celular por apoptosis de los linfocitos B que reconocen con alta afinidad antígenos propios. Las células WEHI-231 han sido ampliamente usadas para el estudio de este mecanismo y en trabajos previos se determinó que estas células expresan el receptor de PRL y únicamente se detectó la isoforma larga. Además, al incubarlas con PRL y después entrecruzar el BCR, hubo un incremento en la sobrevivencia de estas células. Por lo que resulta interesante determinar la participación de la PRL y su receptor en la apoptosis de la línea celular WEHI-231; así como determinar las vías de señalización inducidas por la PRL en estas células.

## **HIPÓTESIS**

La PRL promoverá el rescate de la apoptosis inducida por entrecruzamiento del BCR a células WEHI-231 y activará vías de señalización iniciadas por la unión con su receptor como son JAK-STAT, PI3K-AKT y MAPK.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la participación de la prolactina y su receptor en la apoptosis, así como las vías de señalización inducidas por la PRL en una línea celular de linfocito B inmaduro.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar la participación de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231.
2. Determinar la activación de las moléculas STAT-1, STAT-3 Y STAT-5 en células WEHI-231 incubadas con y sin PRL
3. Determinar la activación de las moléculas AKT y ERK1/2 en células WEHI-231 incubadas con y sin PRL

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Línea celular.**

La línea celular WEHI-231 proveniente de linfoma de células B de ratones (BALB/c x NZB) F1 fue mantenida en medio RPMI (Hyclone, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, USA), antibióticos (Invitrogen, USA), piruvato de sodio (Hyclone, USA) y beta-mercaptoetanol (Invitrogen, USA). Se mantuvieron en incubación a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Hormona.**

Se utilizó prolactina recombinante de ratón (National Hormone and Peptide Program, NIH).

### **Anticuerpos.**

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-caspasa-3 activa de BD, anti-STAT1-APC (clona 4a) de BD Phosflow, anti STAT3-PE (clona 4/P-STAT3) de BD Phosflow, anti-STAT5 (clona 47/Stat [pY69]) de BD Phosflow, Anti-ERK1/2 pT202/pY204 (clona: REA152) de Miltenyi Biotec y Anti-Akt pS473, (clona: REA359) de Miltenyi Biotec.

### **Apoptosis.**

Las células WEHI-231 fueron incubadas una hora con PRL (50ng/ml) y posteriormente se estimularon con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> de Jackson Immunoresearch (10mg/ml) durante 48 horas. Como controles se usaron células con medio, células incubadas con PRL y células incubadas únicamente con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub>. Al finalizar el tiempo de incubación se lavaron con PBS y se les adicionó un marcador de viabilidad Ghost-Red por 30 minutos a 4°C en oscuridad; las células vivas son negativas para Ghost-Red, mientras que las muertas son positivas para este marcador. Posteriormente las células se dividieron en dos, las primeras fueron marcadas con Anexina V-FITC según el protocolo del proveedor y las segundas fueron permeabilizadas con 100µl de Citofix/Citoperm de BD Biosciences durante 1 hora a 4°C posteriormente las células fueron lavadas con Permawash de BD Biosciences y marcadas con anti-caspasa 3 activa acoplado a FITC por 1 hora a 4°C en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro MACSQuant Analyzer 10 y analizadas con el software Flowjo.

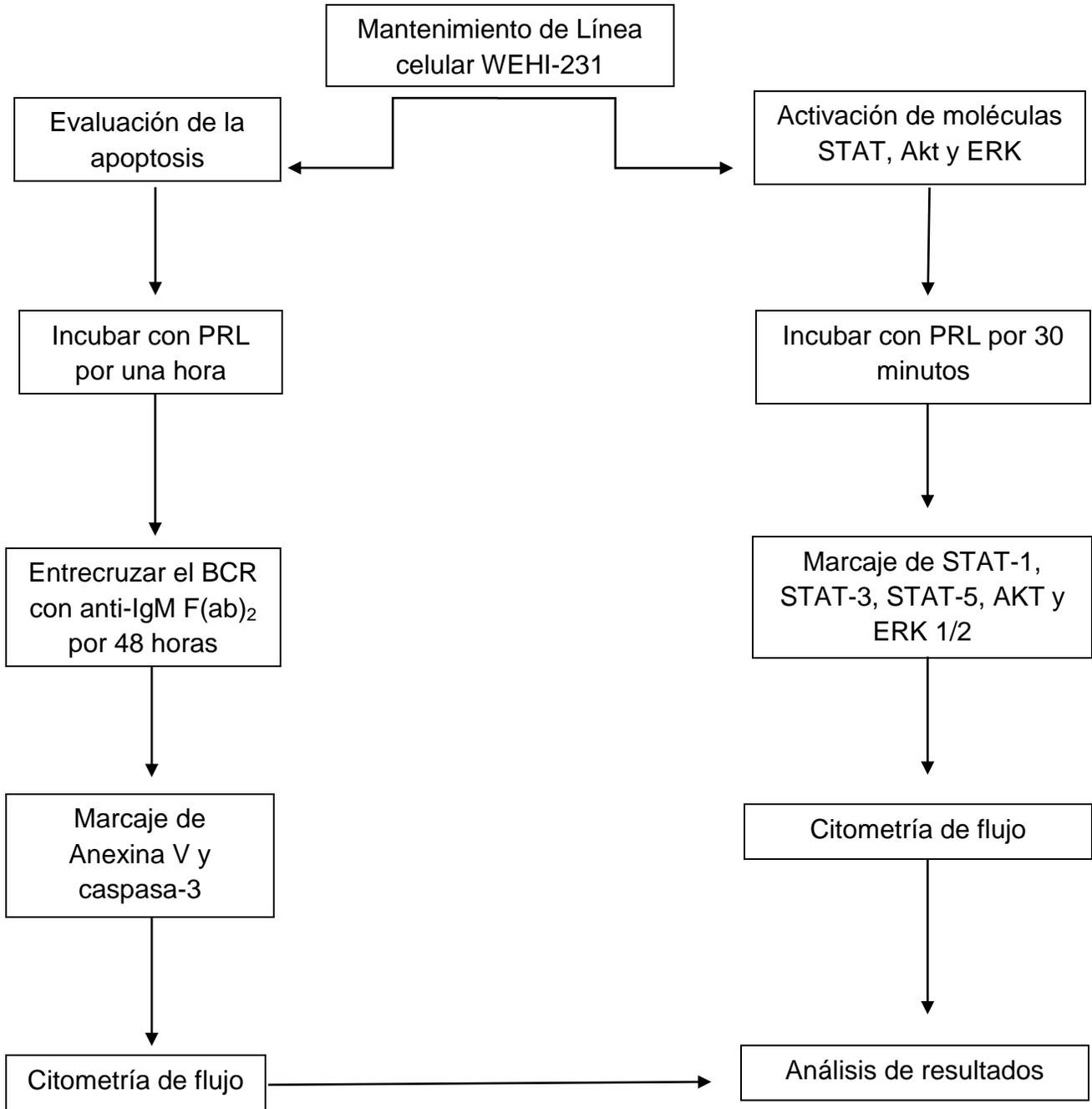
### **Tinción para fosfoproteínas.**

Las células WEHI-231 fueron incubadas 30 minutos con PRL (50ng/mL), posteriormente se fijaron por 10 min a 37°C con 100µL de Lyse/Fix Buffer 5x de BD Phosflow al 1x, al cual previamente se le mantuvo a 37°C. Posteriormente las células se permeabilizaron con 100µL de Perm Buffer III de BD Phosflow para los STATs y con 100µL de IC Fixation Buffer de eBioscience, para AKT y ERK1/2 durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se lavaron con FACS buffer y se incubaron con los siguientes anticuerpos anti-STAT1-APC, anti-STAT3-PE, anti-STAT5-VioBlue, anti-AKT-PE y anti-ERK1/2-PE durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavaron y se resuspendieron con FACS Buffer. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro MACSQuant Analyzer 10 y analizadas en el software Flowjo.

### **Análisis estadístico.**

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (promedio y desviación estándar). Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de t student. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ , el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de computo SPSS 15.

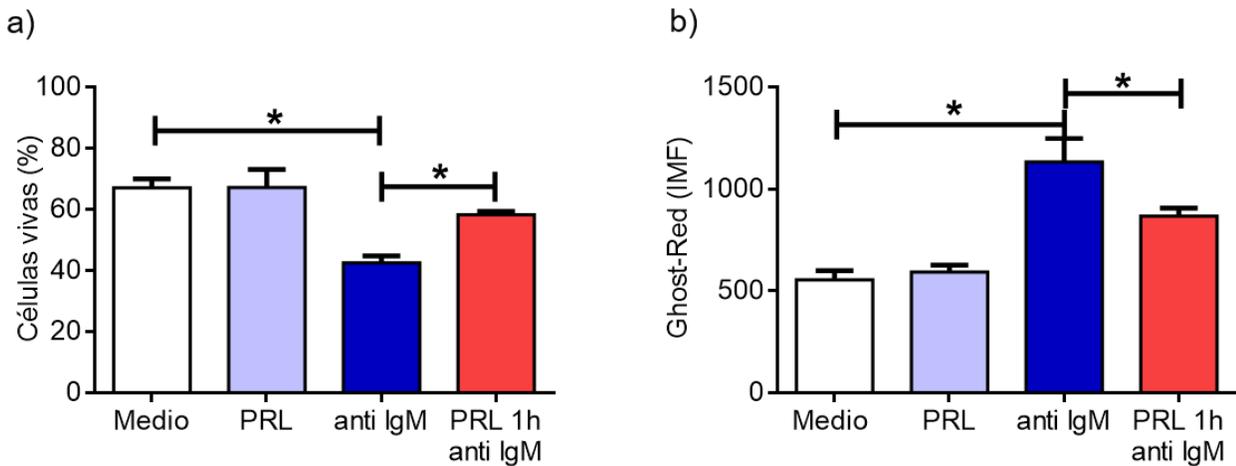
## DIAGRAMA DE FLUJO



## RESULTADOS

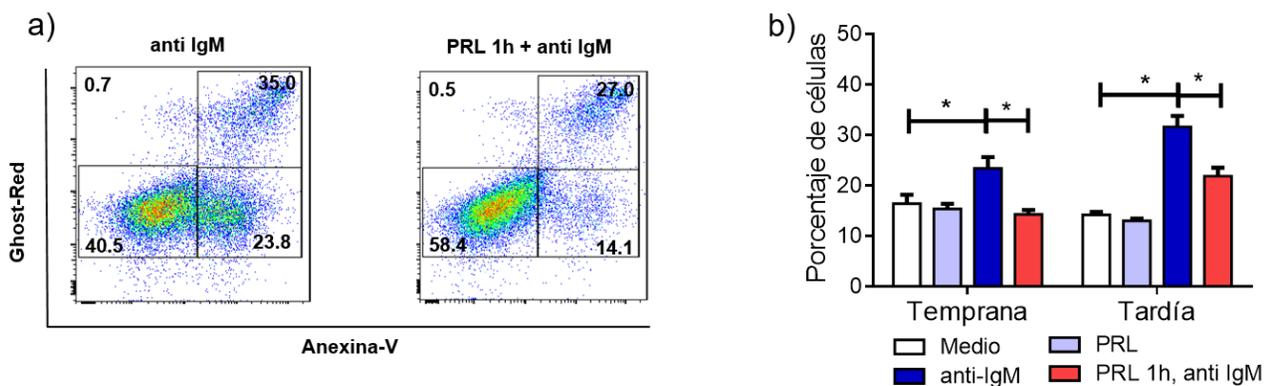
### Efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis de células WEHI-231

Los linfocitos B inmaduros son sujetos a mecanismos de selección negativa para la eliminación de clonas autoreactivas. Para determinar el efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis en las células WEHI-231, las células fueron pre-incubadas 1 hora con PRL (50ng/ml) y posteriormente con fragmentos de anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> para inducir entrecruzamiento del BCR, lo cual mimetiza el reconocimiento de antígenos. El porcentaje de células vivas y en apoptosis fue determinado mediante citometría de flujo. Las células que fueron incubadas con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células vivas (40.93 ± 0.87%; p<0.01) en comparación con las células incubadas con medio (65.72 ± 1.96%) o con PRL (67.10 ± 5.90%). Mientras que las células incubadas con PRL y con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células vivas (58.42 ± 0.82%; p<0.01) comparado con las células que no fueron incubadas con PRL (Figura 7).



**Figura 7. Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231.** Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas una hora con PRL e incubadas con fragmentos anti IgM F(ab')<sub>2</sub> por 48 horas. Las células se marcaron con Ghost-Red. a) Porcentaje de células vivas y b) IMF Ghost-Red. \*p<0.01 n=6.

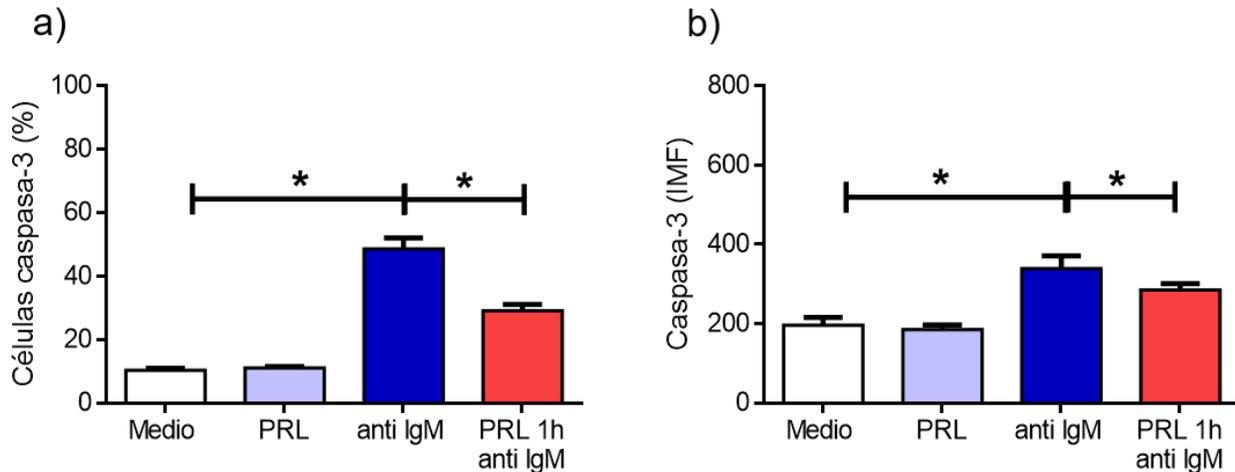
Para la determinación de las células en apoptosis se emplearon dos criterios: el primero fue el marcaje con Anexina V y Ghost-Red y el segundo el marcaje con caspasa-3 activa. El porcentaje de células en apoptosis temprana (Annexin V<sup>+</sup> Ghost-Red<sup>-</sup>) y apoptosis tardía (Annexin V<sup>+</sup> Ghost-Red<sup>+</sup>) aumentó significativamente en las células incubadas con anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (23.88 ± 2.56 y 31.62 ± 2.66%; p<0.01) comparado con el porcentaje de células incubadas con medio (16.23 ± 2.02 y 14.28 ± 0.71%) o con PRL (15.37 ± 0.97 y 13.0 ± 0.44%). Una disminución significativa en el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía (14.44 ± 0.99 y 21.92 ± 2.00%; p<0.01) se observó en las células incubadas con PRL y con anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> en comparación con las células que no fueron incubadas con PRL (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por Anexina V.** Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con fragmentos anti IgM F(ab')<sub>2</sub> por 48 horas. Las células se marcaron con Ghost-Red y Anexina V-FITC para medir la apoptosis temprana (Annexin V<sup>+</sup> Ghost-Red<sup>-</sup>) y apoptosis tardía (Annexin V<sup>+</sup> Ghost-Red<sup>+</sup>). a) Dot-Plot representativo del marcaje con Anexina V y Ghost-Red y b) Porcentaje de células en apoptosis. \*p<0.01 n=6.

Por otro lado, el porcentaje de células caspasa-3 activa aumentó significativamente en las células que fueron incubadas con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (50.76 ± 1.35%; p<0.01) comparado con las células incubadas con medio (9.99 ± 0.33%) o solo con PRL (11.0 ± 0.44%). Mientras que el porcentaje de células caspasa-3 activa disminuyó significativamente en las células incubadas con PRL y con fragmentos anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (29.50 ± 1.93%; p<0.01) en comparación con las células que no fueron incubadas con PRL. Las mismas diferencias

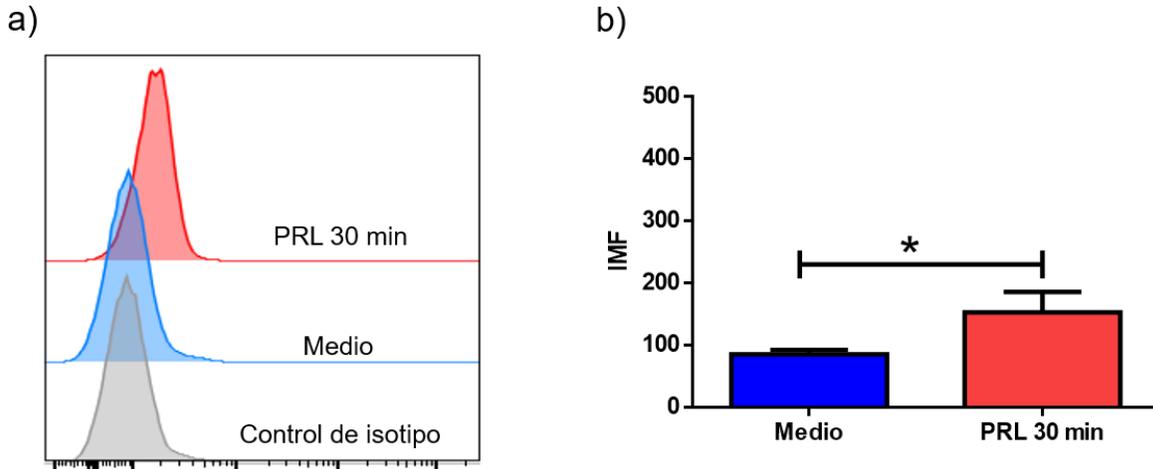
fueron encontradas al determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF) [(Medio  $197.5 \pm 22.4$ ; PRL  $185.3 \pm 11.68$ ; anti-IgM F(ab')<sub>2</sub>  $342.2 \pm 35.9$ ; PRL 1 hora y anti-IgM F(ab')<sub>2</sub>  $292.3 \pm 11.4$ ] (Figura 9).



**Figura 9. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3.** Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con fragmentos anti IgM F(ab')<sub>2</sub> por 48 horas. Las células se marcaron con Ghost-Red y un anticuerpo anti-caspasa-3 activa. a) Porcentaje de células caspasa-3+ activa y b) IMF de caspasa-3 activa. \*p<0.01 n=6.

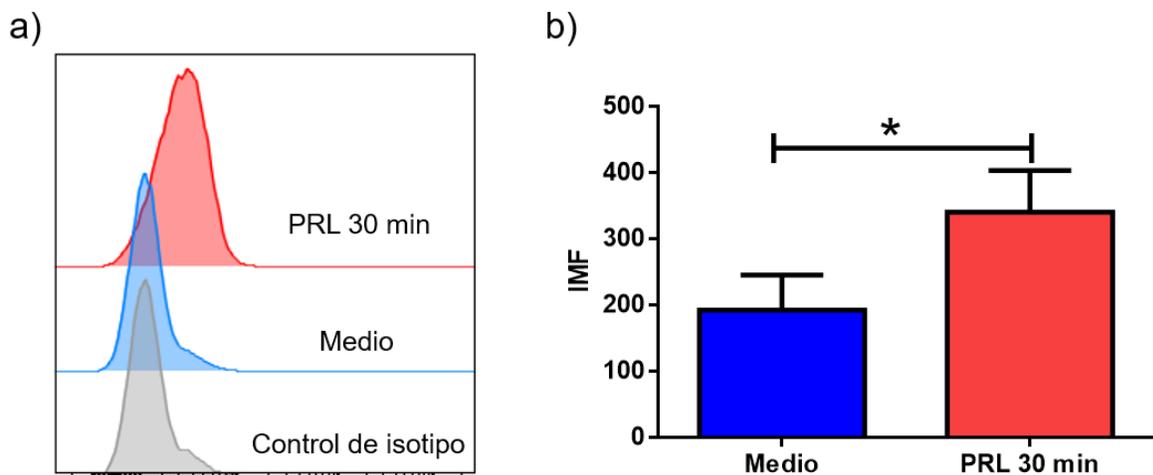
### Efecto de la PRL en la activación de moléculas STAT

Para determinar el mecanismo por el cual la PRL promueve el rescate de las células WEHI-231 de la apoptosis, decidimos determinar la activación de las moléculas STAT-1, 3 y 5 las cuales son activadas por el receptor de PRL. En la figura 10 se muestra la activación de STAT-1, las células incubadas con medio mostraron niveles basales de STAT-1 fosforilado ( $85.67 \pm 6.89$  IMF), mientras que las células incubadas con PRL (50ng/mL) durante 30 minutos mostraron un incremento en la activación de STAT-1 ( $153.33 \pm 32.90$  IMF).



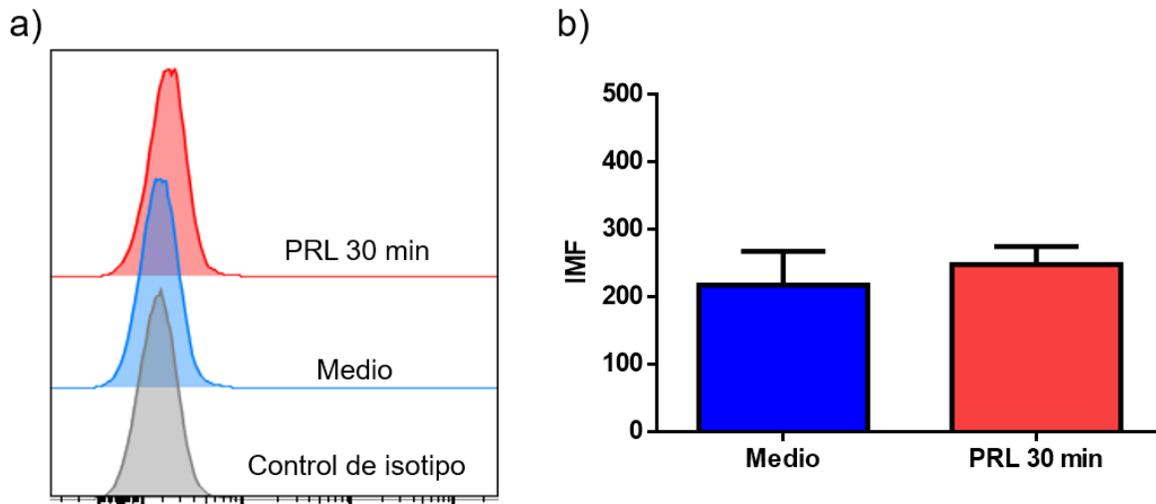
**Figura 10. Efecto de la PRL en la activación de STAT-1.** Las células WEHI-231 fueron incubadas con PRL por 30 minutos, a continuación, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con un anticuerpo anti-STAT-1. En a) se observan los histogramas que representan la activación de STAT-1, y en b) se muestran las IMF para STAT-1. \* $p < 0.01$   $n = 6$ .

En lo que se refiere al STAT-3, su activación se observa en la figura 11, en donde las células que solo se incubaron con medio mostraron niveles de activación basales ( $193.00 \pm$  D.E. 52.91 IMF), mientras que las células que fueron incubadas con PRL (50ng/mL) por 30 minutos mostraron un incremento en la fosforilación de STAT-3 ( $334.71 \pm$  D.E. 59.72 IMF) .



**Figura 11. Efecto de la PRL en la activación de STAT-3.** Las células WEHI-231 fueron incubadas con PRL por 30 minutos, a continuación, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con un anticuerpo anti-STAT-3. En a) se observan los histogramas que representan la activación de STAT-3, y en b) se muestran las IMF para STAT-3. \* $p < 0.01$   $n = 6$

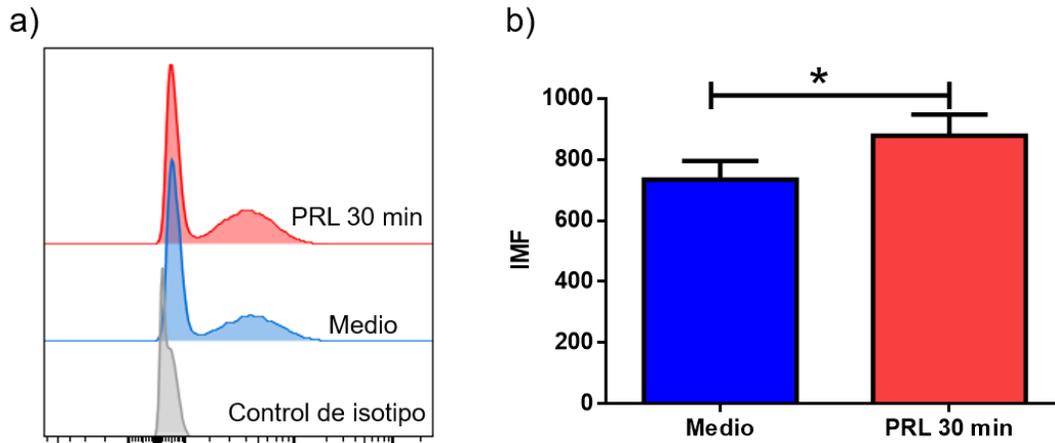
Finalmente, al determinar la activación de STAT-5 no observamos diferencia entre las células incubadas con medio ( $217.75 \pm 50.02$  IMF) y las células con PRL ( $241.75 \pm 50.02$  IMF) (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de la PRL en la activación de STAT-5.** Las células WEHI-231 fueron incubadas con PRL por 30 minutos, a continuación, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con un anticuerpo anti-STAT-5. En a) se observan los histogramas que representan la activación de STAT-5, y en b) se muestran las IMF para STAT-5  $n=6$

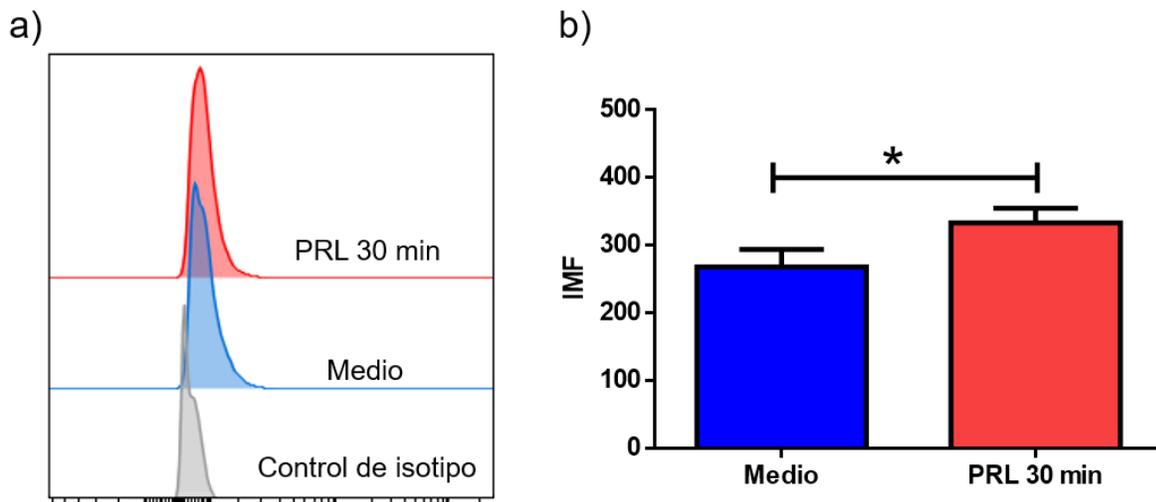
### Efecto de la PRL en la activación de AKT y ERK1/2

Se sabe que la PRL, a través de la unión a su receptor, también puede activar las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK, por lo que decidimos determinar la activación de AKT y de ERK1/2. En la figura 13 se muestran los resultados de la activación de AKT, en donde observamos que las células incubadas con medio tienen una activación basal ( $734.67 \pm 60.53$  IMF), mientras que las células que fueron incubadas con PRL durante 30 minutos mostraron un incremento en la fosforilación de AKT ( $845.750 \pm 112.962$  IMF).



**Figura 13. Efecto de la PRL en la activación de AKT.** Las células WEHI-231 fueron incubadas con PRL por 30 minutos, a continuación, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con un anticuerpo anti-AKT. En a) se observan los histogramas que representan la activación de AKT, y en b) se muestran las IMF para AKT. \* $p < 0.01$   $n = 6$

Por último, al determinar la activación de ERK1/2 las células WEHI-231 incubadas con medio presentaron niveles basales de activación ( $268.25 \pm 25.80$  IMF), mientras que las células con PRL ( $330.14 \pm 21.60$  IMF) incrementaron la activación de ERK1/2 como se muestra en la figura 14.



**Figura 14. Efecto de la PRL en la activación de ERK1/2.** Las células WEHI-231 fueron incubadas con PRL por 30 minutos, a continuación, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con un anticuerpo anti-ERK1/2. En a) se observan los histogramas que representan la activación de ERK1/2, y en b) se muestran las IMF para ERK1/2. \* $p < 0.01$   $n = 6$

## DISCUSIÓN

La línea celular de ratón WEHI-231 presenta un fenotipo de linfocito B inmaduro y tiene la característica que al entrecruzar su BCR son eliminadas por apoptosis (17-19); lo cual mimetiza la interacción del BCR con antígenos. En trabajos previos se demostró que las células WEHI-231 expresan el receptor de PRL y únicamente expresan la isoforma larga. En este trabajo demostramos que al pre-incubar las células WEHI-231 con PRL e incubar con anti-IgM, hay un aumento en la sobrevivencia y hay disminución en la apoptosis, en comparación con las células que no fueron incubadas con PRL. Estos datos indican que esta hormona rescata a las células WEHI-231 de la apoptosis; algunas publicaciones han demostrado que los linfocitos B de ratones B6.Sle.3 son más resistentes a la apoptosis al ser tratados con PRL (46), también se sabe que esta hormona puede actuar como un factor de sobrevivencia ya que incrementa la expresión de moléculas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 en células Nb2 y actúa como un factor de crecimiento en células Jurkat (47,48).

Para entender cómo la PRL rescata a las células WEHI-231 de la apoptosis; investigamos las diferentes vías de señalización activadas a través de la isoforma larga del receptor de PRL, las cuales son JAK-STAT, PI3K-AKT y MAPK (7, 29). Se ha reportado que en las células Nb2, la PRL activa la vía de señalización JAK-STAT5, en este estudio se realizó una cinética de tiempo y concentración encontrando que la concentración óptima de PRL es de 50ng/ml y el tiempo óptimo de estímulo de 30 minutos (35). Además, nuestro grupo de trabajo confirmó estos resultados (datos no mostrados). Por lo que estas fueron las condiciones empleadas para realizar los ensayos de señalización.

Lo primero que se determinó fue la activación de STAT-1, 3 y 5, los cuales se ha reportado que son activados por la PRL (24). Nuestros resultados mostraron que la PRL promueve la activación de STAT-1 y STAT-3 pero no STAT-5 en las células WEHI-231. Se sabe que en células de cáncer de colon incubadas con PRL se induce la activación de JAK-STAT3 lo cual promueve la expresión del ligando de Notch (49), mientras que, en células de cáncer de mama, se ha encontrado que la PRL activa la vía JAK-STAT (50). Por otro lado se ha reportado que la vía de señalización JAK-STAT; a través de STAT-1 puede interactuar con p53 e inducir apoptosis (51,52), mientras que a través de STAT-3 es capaz de aumentar la

expresión de genes anti-apoptóticos en células de músculo liso (53) y en células de mieloma (54). En las células WEHI-231, la PRL es capaz de activar STAT-1 y 3, siendo mayor la activación de este último, lo que sugiere un rescate de la apoptosis en estas células.

Para evaluar la vía de señalización PI3K-AKT determinamos la fosforilación AKT. Nuestros resultados mostraron que la PRL promueve la activación de AKT en las células WEHI-231. Se sabe que el entrecruzamiento del BCR puede promover la muerte celular suprimiendo la actividad de PI3K-AKT (55), ya que esta vía de señalización está relacionada con la supervivencia activando genes anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (56). Además, se sabe que la PRL es capaz de rescatar células Nb2 de la apoptosis a través de la vía PI3K-AKT (57). Lo cual sugiere que en las células WEHI-231 esta vía de señalización también está involucrada en el rescate de las células de la apoptosis.

Finalmente, al explorar la vía de señalización de las MAPK se determinó la fosforilación de ERK1/2 en las células WEHI-231 incubadas con PRL, encontrando que esta hormona promueve la activación de esta vía. Se sabe que la vía de las MAPK está relacionada con proliferación y diferenciación (58). Se ha reportado que en células endoteliales la PRL activa la vía ERK1/2, lo cual implica la inducción de proliferación y migración de estas células (59), de igual manera en células de hígado de rata, la PRL induce la activación de la vía MAPK (60). En células Nb2, esta hormona también activa la vía de MAPK promoviendo su proliferación (61); así como en células de páncreas, en donde se reportó un incremento en los islotes pancreáticos (62). Mientras que a nivel de SNC, la PRL también activa la vía MAPK en rata (63). También hay reportes que indican que esta vía de señalización puede promover la supervivencia de células B (17,64). Nuestros resultados indican que la PRL es capaz de activar MAPK, lo cual podría sugerir la participación de esta hormona en la proliferación de estas células, así como en el rescate de la apoptosis.

Todos nuestros resultados en conjunto nos indican que la PRL está rescatando de la apoptosis a las células WEHI-231 a través de la activación de las vías de señalización JAK-STAT-3, PI3K-AKT y MAPK, quedaría por comprobar la contribución de cada una de estas vías usando inhibidores para cada una de ellas y para el receptor de PRL. Además estas vías

de señalización tienen como blanco genes apoptóticos de la familia Bcl-2, por lo que sería importante determinar si la PRL también modula la expresión de estos genes en estas células y si promueve su proliferación vía MAPK.

Estos resultados permiten conocer el efecto que tiene la PRL en un modelo de tolerancia de linfocitos B inmaduros, lo cual resulta importante por la participación de esta hormona en las enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES), en donde se asocia con exacerbación de la enfermedad en pacientes (65) y modelos en ratón (66), en donde hay una acumulación de clones autoreactivos de linfocitos B (67), lo que sugiere fallas en los mecanismos de tolerancia de estas células (68). Nuestros resultados en las células WEHI-231 sugieren que la PRL podría participar en el rompimiento de la tolerancia del linfocito B, lo cual será necesario comprobar en un modelo de autoinmunidad.

## **CONCLUSIONES**

La PRL rescata de la apoptosis inducida por entrecruzamiento del BCR a las células WEHI-231; a través de la isoforma larga del receptor de PRL, activando las vías de señalización JAK-STAT3 PI3K-AKT y MAPK.

## REFERENCIAS

1. Nagasawa T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6:107–116.
2. Hoffman W, Lakkis G. F. and Chalasani G. 2016. B Cells, Antibodies, and More. *Renal Immunology.* 11:137-154.
3. Mandel E. and Grosschedl R. 2010 Transcription control of early B cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 22:161–167.
4. Nutt S. and Kee B. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity.* 26:715–725.
5. Hardy R. and Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19:595–621.
6. Kurosaki T, Shinohara H. and Baba Y. 2010. B cell signalling and fate decision. *Annu. Rev. Immunol.* 28:21–55.
7. Schatz D. and Yanhong J. 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11:251-263.
8. Basten A. and Silveira A. 2010. B cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* 22:566-574.
9. Melchers Fritz. 2015. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest.* 125:2203-2210.
10. Nemazee D. 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 6:728-40.
11. Pelanda R. and Torres R. 2006. Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* 18:184-190.
12. Nemazee D. and Burki K. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 337:562-566.
13. Goodnow C, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie T, Smith-Grill S. and Brink R. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* 334:676-682.
14. Cambier J, Gauld S, Merrell K. and Vilen B. 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?. *Nat. Rev. Immunol.* 7:633–643.

15. Pennell CA, Scott DW. 1986. Lymphoma models for B cell activation and tolerance. IV. Growth inhibition by anti-Ig of CH31 and CH33 B lymphoma cells. *Eur J Immunol.* 16:1577-81.
16. Gottschalk AR, Quintáns J. Apoptosis in B lymphocytes: the WEHI-231 perspective. *Immunol Cell Biol.* 1995;73(1):8-16.
17. Takada E, Toyota H, Suzuki J. and Mizuguchi J. 2001. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. *J Immuno.* 166:1641-1649.
18. Katz E, Lord C, Ford C, Gauls S, Carter N. and Harnett M. 2004. Bcl-xL antagonism of BCR-coupled mitochondrial phospholipase A2 signalling correlates with protection from apoptosis in WEHI-231 B cells. *Blood.* 103:168-176.
19. Malissein E, Verdleer M, Ratinaud M. and Trotaud D. 2006. Activation of Bad trafficking is involved in the BCR mediated apoptosis of immature B cells. *Apoptosis.* 11:1003-1012.
20. García Méndez Karen. Tesis de Licenciatura. 2016
21. Petri M. 2008. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 17:412-415.
22. Shelly S., Boaz M. and Orbach H. 2011. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 11:A465-A470
23. Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut R, Rajda K. and Guzik T. 2012. Prolactin Not only lactotrophin. A “new view of the old” hormone. *J. of Physiology and Pharmacology.* 63:5:435-443.
24. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 19:225-268.
25. Blanco F, Legorreta M, Huerta Y, Chávez K, Montoya E, Chávez L, Zenteno E. 2012. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Bol Med Hosp Infant Mex* 69:329-336.
26. Piwnica D, Fernandez I, Binart N, Touraine, Kelly PA, Goffin V. 2006. A new mechanism for prolactin (PRL) processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol Endocrinol* 20:3263-3278.
27. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. 2015. New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol.* 11:265-275.

28. Touraine P, Moraes M, Dardenne M. and Kelly P. 1994. Expression of short and long form of prolactin receptor in murine lymphoid tissues. *Mol. And Cell Endocrinology*. 104:183-190.
29. Binart N, Bachelot A and Bouilly J. 2010. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 21: 362–368.
30. Reuwer A, Nowak-Sliwinska P, Mans L, Van der Loos C, Von der Thüsen J, Twickler M, Spek A, Goffin V, Griffioen A. and Borensztajn K. 2012. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *J. Cell. Mol. Med.*16: 2035-2048.
31. Creamer B, Sakamoto K, Schmidt J, Triplett A, Moriggl R, and Wagner K. 2010. Stat5 Promotes Survival of Mammary Epithelial Cells through Transcriptional Activation of a Distinct Promoter in Akt1. *Molecular and Cellular Biology*. 30: 2957–2970.
32. Hair W, Gubbay O, Jabbour H and Lincoln G. 2002. Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Molecular Human Reproduction*. 8: 606–611.
33. Jabbour H, Critchley H, and Boddy S. 1998. Expression of Functional Prolactin Receptors in Nonpregnant Human Endometrium: Janus Kinase-2, Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (STAT1), and STAT5 Proteins Are Phosphorylated after Stimulation with Prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83: 2545-2552.
34. Gubbay O, Critchley H, Bowen J, King A and Jabbour H. 2002. Prolactin Induces ERK Phosphorylation in Epithelial and CD56+ Natural Killer Cells of the Human Endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87:2329–2335.
35. Coss D, Benson C, Yang L, Ingleton P, Luben R, and Walker A. 1999 Dissociation of Janus Kinase 2 and Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Activation after Treatment of Nb2 Cells with a Molecular Mimic of Phosphorylated Prolactin. *Endocrinology*. 140: 5087-5094.
36. Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac. Rec.* 47:119-129.
37. Nagy E, Berczi I, Wren G, Asa S. and Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacol.* 6:231-243.

38. Spangelo B, Farrimond D, Pompilius M. and Bowman K. 2000. Interleukin-1 beta and thymic peptide regulation of pituitary and glial cell cytokine expression and cellular proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:597-607.
39. De Laurentiis A, Pisera D, Caruso C, Candolfi M, Mohn C, Rettori V. and Seilicovich A. 2002. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic pituitary axis. *Neuroimmunomodulation.* 10:30-39.
40. Carreno P, Sacedon R, Jimenez E, Vicente A. and Zapata A. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol.* 160:135-145.
41. Sun R, Gault R, Welniak L, Tian Z, Richards S. and Murphy W. 2003. Immunologic and hematopoietic effects of recombinant human prolactin after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* 9:426-434.
42. Horseman N, Zhao W, Montecino E, Tanaka M, Nakashima K, Engle S, Smith F, Markoff E. and Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16:6926-6935.
43. Bouchard B, Ormandy C, Di Santo J. and Kelly P. 1999. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 163:576-582.
44. Morales P, Carretero M, Geronimo H, Copín S, Gaspar M, Marcos M. and Martín J. 1999. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Differ.* 10:583-590.
45. Fresno Vara J, Domínguez Cáceres M, Silva A and Martín Pérez J. 2001. Src Family Kinases Are Required for Prolactin Induction of Cell Proliferation. *Molecular Biology of the Cell.* 12: 2171–2183.
46. Peeva E, Gonzalez J, Hicks R. and Diamond B. 2006. Cutting edge: lupus susceptibility interval *Sle3/5* confers responsiveness to prolactin in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 177:1401-1405.
47. Kochendoerfer S, Krishnan N, Buckley D. and Buckley A. 2003. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J. Endocrinol.* 178:265-73.

48. Matera L, Cutufia M, Geuna M, Contarini M, Buttiglieri S, Galin S, Fazzari A and Cavaliere C. 1997. Prolactin is an autocrine growth factor for the Jurkat human T-leukemic cell line. *Journal of Neuroimmunology* 79: 12–21.
49. Neradugomma N, Subramaniam D, Tawfik O, Goffin V, Kumar T, Jensen R and Anant S. 2014. Prolactin signaling enhances colon cancer stemness by modulating Notch signaling in a Jak2-STAT3/ERK manner. *Carcinogenesis*.35: 795–806.
50. Qian L, Lopez V, Ah Seo Y and Kelleher S. 2009. Prolactin regulates ZNT2 expression through the JAK2/STAT5 signaling pathway in mammary cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 297: 369–377.
51. Stephanou A and Latchman D. 2003. STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 84, 239–244
52. Townsend P, Scarabelli T, Davidson S, Knight R, Latchman D, and Stephanou A. 2004. STAT-1 Interacts with p53 to Enhance DNA Damage-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 5811-5820.
53. Fu Y, Zhao Y, Liu Y, Zhu Y, Chi J, Hu J, Zhang X. and Yin X. 2012. Adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene transfer induces apoptosis by blocking the phosphorylation of JAK-2/STAT-3 pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 10:1909-17.
54. Catlett-Falcone R, Landowski T, Oshiro M, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna J, Nuñez G, et al. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. 10:105-115.
55. Carey G, Semenova E, Qi X, and Keegan A. 2007. IL-4 protects the B-cell lymphoma cell line CH31 from anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis: contribution of the PI-3 kinase/AKT pathway. *Cell Research*. 17:942-955
56. Fan Y, Yang F, Cao X, Chen C, Zhang X, Zhang X, Lin W, Wang X and Liang C. 2016. Gab1 regulates SDF-1-induced progression via inhibition of apoptosis pathway induced by PI3K/AKT/Bcl-2/BAX pathway in human chondrosarcoma. *Tumour Biol*.37:1141-1149.
57. Al-Sakkaf K, Mooney L, Dobson P and Brown B. 2000 Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Journal of Endocrinology* 167: 85–92.

58. Robert Roskoski Jr. 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66:105–143.
59. Reuwer A, Nowak-Sliwinska P, Mans L, Van der Loos C, H. von der Thüsen J, Twickler M, Spek A, Goffin V, Griffioen A, and Borensztajn K. 2012. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology?. *J. Cell. Mol. Med.* 16: 2035-2048.
60. Piccoletti R, Bendinelli P, Maroni P. 1997. Signal transduction pathway of prolactin in rat liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 135: 169–177.
61. Schwertfeger K, Hunter S, Heasley L, Levresse V, Leon R, DeGregori J, and Anderson S. 2000. Prolactin Stimulates Activation of c-jun N-Terminal Kinase (JNK) *Molecular Endocrinology* 14: 1592–1602
62. Amaral M, Cunha D, Anê G, Ueno M, Carneiro E, LVelloso L, Bordin S and Boschero A. 2004. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *Journal of Endocrinology*. 183: 469–476
63. Blume A, Torner L, Liu Y, Subburaju S, Aguilera G, and Neumann I. 2009. Prolactin Activates Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Corticotropin Releasing Hormone Transcription in Rat Hypothalamic Neurons *Endocrinology*. 150:1841–1849
64. Takada E, Hata K and Mizuguchi J. 2006. Requirement for JNK-dependent upregulation of BimL in anti-IgM-induced apoptosis in murine B lymphoma cell lines WEHI-231 and CH31. *Exp Cell Res*. 2006 Nov 15;312(19):3728-38. Epub 2006 Aug 12.
65. Karimifar M, Tahmasebi A, Bonakdar Z, et al. 2013. Correlation of serum prolactin levels and disease activity in systematic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 33:511-516.
66. Ledesma Y, Blanco F, Fuentes E, Tesoro E, Hernández R, Arriaga L, Legorreta M, Montoya E, Chávez L, Castro M. and Chávez K. 2012. Higher levels of PRL receptor in Transitional 1 B cells correlates with increased numbers of this population after PRL treatment and an early onset of lupus symptoms. *BMC Immunology*. 13:11
67. Kaul A, Gordon C. and Crow M. 2016. Systemic Lupus Erythematosus. *Nat Rev Disaes Primer*. 2:1-21.

68. Yurasov S, Waremann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V. and Nussenzweig M. 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201:703-711.

## ANEXO

### Preparación de reactivos

#### PBS 10x pH=7.4

- NaCl 40.0g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.2g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2g
- H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 500mL

#### Regulador FACS

- PBS 1x
- SFB 0.5%
- EDTA 2mM
- Azida de sodio

#### Medio RPMI 10% SFB

- Medio RPMI
- SFB
- Antibioticos 1X
- β-mercaptoetanol 1X

#### Medio TexMacs

- Medio TexMacs
- Antibioticos 1X
- β-mercaptoetanol 1X