



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Miguel Barría M.

INSTITUTO: Inmunología

FACULTAD: Medicina

“EFECTO DE BROMOCRIPTINA EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA AUTOINMUNE EN RATONES”.

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

OLIVA KARINA ESPINOZA SOBARZO

VALDIVIA-CHILE

2008

*Con inmenso cariño, a mis queridos padres, Isolde y Victor y mi hermano David.
Gracias.*

Agradecimientos.

En primer lugar, doy gracias a Dios por acompañarme en todas las etapas de mi vida, ya que sin su ayuda nada de esto sería posible.

Agradezco de todo corazón a mis queridos padres Isolde y Víctor, que con su inmenso amor, dedicación y sacrificio han logrado formar en mí una persona de valores, con esperanzas, sueños y principalmente, una mujer inmensamente feliz. Agradezco a mi hermano David, el cual me ha apoyado en todo momento como amigo y confidente. Gracias por depositar su confianza en mí y por ayudarme a crecer cada día, siendo ustedes las personitas más importantes mi vida.

A toda mi familia; Espinoza y Sobarzo, gracias por sus buenos deseos.

A mis amigos y compañeros gracias por el apoyo y comprensión.

A mi querido Esteban, por hacer de esta etapa una de las más bellas de mi vida gracias a tu cariño, simpatía y confiabilidad.

A mi querido profesor patrocinante, Dr. Miguel Barría M., quien puso en mí las herramientas necesarias para realizar esta tesis, gracias por los conocimientos entregados y su calidad humana. Además, agradezco a todos los académicos, administrativos y funcionarios, en especial; Dr. Hugo Folch V., Luz Epuante y Priscilla Muñoz, del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina, por quererme y ayudarme durante este proceso.

Finalmente, quiero agradecer a mí querida mamita Isolde (Q.E.P.D.), por su inmenso amor y deseo que este momento llegara para sentirse feliz y orgullosa.

A todos ustedes, gracias.

INDICE DE CONTENIDOS.

	Página
RESUMEN	6
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN.	10
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVO GENERAL.....	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
5.1 Animales de experimentación.	25
5.2 Antígeno.....	25
5.3 Disolución de Bromocriptina.	26
5.4 Tratamiento con bromocriptina a ratones experimentales.	27
5.5 Inducción de Tiroiditis Autoinmune Experimental.	28
5.6 Obtención de sueros de animales de experimentación.....	28
5.7 Determinación de niveles de autoanticuerpos.	29
5.8 Determinación de niveles de prolactina.	30
5.9 Obtención de tiroides.	31
5.10 Cortes de tejido.	32
5.11 Inmunohistoquímica.....	32
5.12 Cultivo de macrófagos J774.2.....	33

5.13	Tratamiento de macrófagos J774.2 con bromocriptina y prolactina.....	34
5.14	Inmunocitoquímica.....	35
5.15	RT – PCR.....	36
5.15.1	Extracción de RNA.....	36
5.15.2	Obtención cDNA.....	37
5.15.3	PCR.....	38
5.15.4	Electroforesis en geles de agarosa.....	39
6.	RESULTADOS.....	40
6.1	Inducción de tiroiditis autoinmune experimental (TAE) en ratones (hembras) tratados con distintas dosis de bromocriptina (BCR).....	40
6.1.1	Análisis histológicos.....	40
6.1.2	Autoanticuerpos anti – tiroglobulina (anti-Tg).....	43
6.2	Niveles de prolactina (PRL) en pool de sueros de ratones tratados con bromocriptina.....	47
6.3	Expresión de p65 (NF- kB), TLR-3 y TLR-4 en el desarrollo de tiroiditis autoinmune experimental.....	52
6.4	Expresión de TLR-3, TLR-4 y p65 en cultivos celulares (J774.2) tratados con bromocriptina.....	57
6.5	Expresión de mRNA para TLR- 3 y TLR- 4 mediante RT- PCR.....	60
7.	DISCUSIÓN.....	62
8.	CONCLUSIONES.....	71
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
10.	ANEXO.....	77

INDICE DE FIGURAS.

	Página.
Figura 1: Tinción con hematoxilina – eosina de cortes histológicos de la glándula tiroides de ratones inmunizados con tiroglobulina y tratados con bromocriptina en altas y bajas dosis.....	42
Figura 2: Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio para cada grupo de ratones experimentales, inmunizados con Tg en coadyuvante.	43
Figura 3: Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio de sueros de ratones experimentales adultos tratados con bajas y altas dosis de BCR, en comparación con sueros de ratones experimentales no tratados con BCR.....	44
Figura 4: Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio para grupos de ratones experimentales jóvenes tratados con bajas y altas dosis de BCR, en comparación con ratones experimentales no tratados con BCR.....	45
Figura 5: Niveles de autoanticuerpos anti – Tg en los sueros de los ratones experimentales sin BCR, con BCR y con vehículo... ..	46
Figura 6: Curva de calibración: % inhibición v/s concentración de prolactina (PRL).....	48
Figura 7: Niveles de PRL en pool sueros de ratones experimentales obtenidos mediante ELISA competitivo.....	49
Figura 8: Concentración de PRL en pool de sueros de animales	

adultos tratados con altas y bajas dosis de BCR al día 5 post – inmunización.....	50
Figura 9: Concentración de PRL en pool de sueros de animales jóvenes tratados con altas y bajas dosis de BCR al día 5 post – inmunización.....	51
Figura 10: Expresión del factor NF- kB en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR	53
Figura 11: Expresión de TLR-3 en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR.....	55
Figura 12: Expresión de TLR-4 en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR.....	56
Figura 13: Expresión de TLR-3 y TLR-4 en líneas celulares J774.2 mediante inmunocitoquímica tras la administración de bromocriptina en comparación con grupos controles.....	58
Figura 14: Expresión de p65 en líneas celulares J774.2 mediante inmunocitoquímica tras la administración de bromocriptina en comparación con grupo control.....	59
Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del producto de RT-PCR del cDNA de TLR -3 en líneas celulares J774.2.....	61
Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del producto de RT-PCR del cDNA de TLR -4 en líneas celulares J774.2.....	61

RESUMEN.

La tiroiditis autoinmune experimental (TAE) es un modelo de tiroiditis de Hashimoto, enfermedad autoinmune órgano-específica mediada por células T, que produce una infiltración linfocitaria mononuclear de la glándula tiroides y la presencia de autoanticuerpos anti-tiroglobulina (anti-Tg). Aunque la etiopatogenia es desconocida aún, se cree que la susceptibilidad de cada individuo a desarrollar patologías autoinmunes está definida tanto por factores genéticos como medio ambientales.

En el presente trabajo se evaluará el efecto de la bromocriptina, alcaloide semisintético derivado del ergot, en el desarrollo de TAE; midiendo los niveles de autoanticuerpos y expresión de receptores toll-like (TLRs) durante el desarrollo de la enfermedad.

Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 los cuales fueron inmunizados con Tg en coadyuvante dos veces. Previo a cada inmunización, se administraron diferentes dosis de bromocriptina, vía intraperitoneal, se obtuvieron muestras de sangre y posteriormente fueron sacrificados para obtener las glándulas tiroides. En los sueros obtenidos se midieron los niveles de autoanticuerpos anti-Tg y la concentración de prolactina mediante ELISA. Por otra parte, se evaluó la expresión de TLR-3, TLR-4 y el factor de transcripción NF- κ B en las glándulas tiroides mediante inmunohistoquímica y en cultivos celulares mediante inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos muestran que la administración de bromocriptina produce un retardo en el inicio de la respuesta inmune humoral y celular en las primeras etapas de la TAE. Se evidencia la expresión de los TLRs en los ratones inmunizados y que el tratamiento con bromocriptina produce

un mayor aumento en la expresión tanto de los TLRs como del factor NF-kB. Además el tratamiento con bromocriptina, en líneas celulares de macrófagos murinos realizado “in vitro”, induce cambios en la expresión de TLR- 3 y TLR- 4.

Por otra parte, se plantea que bromocriptina, podría ejercer un efecto directo sobre las células presentadoras de antígenos, sin descartar el posible efecto ejercido por bromocriptina a partir de la disminución de prolactina.

Por lo tanto, bromocriptina en este modelo experimental, estaría actuando en diferentes niveles del desarrollo de la enfermedad y en la función de las células foliculares tiroideas.

SUMMARY.

The experimental autoimmune thyroiditis (EAT) is a model of Hashimoto's thyroiditis, autoimmune disease body-mediated specific T cells producing mononuclear cell infiltration of the thyroid gland and the presence of anti-thyroglobulin autoantibodies. Although the pathogenesis of this disease is not well understood, it is believed that susceptibility to develop autoimmune diseases is determined by genetic and environmental factors.

The effect of the bromocriptine, synthetic alkaloid ergot derived, in the development of EAT was studied. Auto-antibodies levels and expression of toll-like receptors (TLRs) during the development of the disease were measured.

We used C57BL/6 mice, which were immunized twice with Tg plus adjuvant. Prior to each immunization, different doses of bromocriptine were administered intraperitoneally and was obtained then blood and the animals were sacrificed to obtain the thyroid glands. Anti-thyroglobulin autoantibodies levels and prolactin concentration in serum were measure by ELISA. On the other hand, TLR-3 and TLR-4 expression and NF-kB transcription factor were evaluated in thyroid glands through immunohistochemistry and in cell cultures through immunocytochemistry. The results obtained show that the administration of bromocriptine decrease humoral and cellular immune response in the early stages of the EAT. The evidence of the expression of the TLRs in mice immunized and that treatment with bromocriptine produces an increase the expression of both, TLRs and NF-kB factor.

Moreover, bromocriptine induce changes of TLR-3 and TLR-4 expression, in murine macrophages cellular lines "in vitro".

On the other hand, bromocriptine could be exert a direct effect on the antigen presenting cells, without excluding also the possible bromocriptine effect by decrease prolactin concentration.

Therefore, the bromocriptine in this experimental model, would be acting at different levels of the development of the disease and the thyroid follicular cells function.

1. INTRODUCCIÓN.

El sistema inmune es un notable mecanismo de defensa del organismo, el cual proporciona los medios para generar una respuesta defensiva de los organismos superiores, contra los microorganismos potencialmente patógenos que habitan en el mundo en que vivimos. Esta respuesta se caracteriza por ser rápida, altamente específica y a menudo muy eficiente ¹. Cualquier respuesta inmunitaria implica en primer lugar, el reconocimiento del agente patógeno o de otros materiales extraños y, en segundo lugar, la elaboración de una reacción contra dicho agente, a fin de eliminarlo. En sentido amplio, los diferentes mecanismos defensivos los podemos agrupar en dos categorías: respuesta inmune innata (o no adaptativas) y respuesta inmune adquirida (adaptativa). La principal diferencia entre ambas reside en el carácter extremadamente específico frente a un determinado agente patógeno por parte de la respuesta inmune adquirida. Además, este mecanismo mejora con los sucesivos contactos con el mismo agente; en efecto, el sistema inmune adquirido “recuerda” el agente infeccioso y puede impedir que más tarde desencadene en una enfermedad ².

La respuesta inmune específica o adquirida, puede ser de dos tipos: humoral y celular. Ambas respuestas dependen de los linfocitos que tienen su origen de las células hematopoyéticas totipotenciales, ubicadas en la médula ósea. La descendencia de estas células se diferencia en linfocitos T, responsables de la respuesta inmune celular, y en linfocitos B, responsables de la respuesta inmune humoral ².

Los linfocitos T cumplen una importante función reguladora tanto para la respuesta inmune humoral como celular. Según esto, los linfocitos T los podemos clasificar en linfocitos T “helper” 1 (Th1) que secretan principalmente interferon gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales están encargados de activar la respuesta inmune celular contra diferentes antígenos y los linfocitos T “helper” 2 (Th2), que secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, efectivos en la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y por ende, encargados de modular en forma positiva la respuesta inmune humoral³.

Por otra parte, la respuesta inmune es finamente regulada. Al respecto se han descrito recientemente varias células con capacidad reguladora, como son: las células T reguladoras (Treg) y Th 17. Las células Treg corresponden a un subgrupo especializado de células T que suprimen activamente la respuesta inmune. Los investigadores han clasificado ampliamente las células Tregs como en Treg naturales y Treg inducibles, donde sus efectos supresores están dados por el contacto célula-célula o por citocinas, respectivamente. Las células Treg naturales corresponden a las células T CD4+CD25+ que tiene su origen en el timo y lo abandonan en forma de células efectoras diferenciadas. La mayoría de las células Treg, reconocen autoantígenos por sí mismas, juegan un papel significativo en el equilibrio inmune y la protección contra la autoinmunidad. Por lo tanto, las células Treg naturales son importantes controladores de la tolerancia inmunológica. Las células Treg inducibles se generan a partir de células no reguladoras en la periferia. Aunque el mecanismo inmunosupresivo principal de Tregs es un misterio, varios modelos experimentales “*in vivo*” han indicado que Tregs

secretan grandes cantidades de inmunosupresores incluyendo IL-9, IL-10 y TGF- β . Estas citoquinas son capaces de inhibir la activación de las células Th1 y Th2 ⁴.

Otra población celular recientemente estudiada es la célula Th 17, constituida por células productoras de IL-17A, IL-17F e IL-6, citoquinas han sido involucradas en la mantención de la respuesta autoinmune. Las células Th17 pueden ser generadas en presencia de TGF- β e IL-6 y amplificadas por IL-23 ⁵.

Para que se inicie la respuesta inmune específica, se requiere el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos y subsiguiente activación de los mismos. La unión antígeno – anticuerpo (Ag-Ac) activa al linfocito T o B mediante un delicado proceso bioquímico que implica transducción de señales al interior de la célula, generación de segundos mensajeros (IP₃, DAG, Ca²⁺) y fosforilación de proteínas. Las proteínas fosforiladas, se unen a secuencias reguladoras de genes que participan en la activación de los linfocitos. La activación linfocitaria produce una amplificación clonal, donde posteriormente ocurre una producción de células efectoras, responsables de la síntesis de anticuerpos y células T (linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+), entre otras ⁶.

Los linfocitos B reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas de membrana (IgM e IgD) mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante el receptor de linfocitos T (TCR) ⁶.

Las células presentadoras de antígeno (APC) tienen como misión captar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T. El reconocimiento del antígeno por las células T exige que previamente sea procesado proteolíticamente en el interior de las APC ².

Tal como se ha mencionado, los linfocitos reconocen el antígeno mediante el receptor T (TCR) y lo hacen sólo cuando el antígeno es procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y expuesto en la superficie de estas células, en el seno de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC está constituido por un conjunto de genes que codifican una serie de glicoproteínas presentes en la membrana celular y que desempeñan un rol fundamental en el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T y en la regulación de las interacciones celulares que caracterizan a la respuesta inmune ⁷. Estas moléculas son esencialmente de dos tipos o clases, clase I y clase II y tienen entre otras funciones las de presentar el antígeno a los linfocitos así como participar en el proceso de maduración de los linfocitos en el timo ⁷.

Aunque existen excepciones, la separación de las funciones de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ viene dada por el origen de los antígenos que reconocen y, en último término, por donde han sido procesados. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen a los antígenos que han sido procesados endógenamente en el citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I, mientras que los linfocitos T CD4⁺ reconocen los antígenos procesados por vía exógena, los cuales interactúan con el antígeno en el contexto de moléculas de clase II presentados en una APC. Este fenómeno se conoce como restricción por el MHC, es decir, que el TCR que reconoce específicamente el antígeno ha de encontrarlo presentado en el contexto de moléculas MHC propias. En el proceso de reconocimiento e interacción de una célula con otra intervienen, además, toda una serie de moléculas llamadas moléculas accesorias que se encuentran en la superficie de los linfocitos T o en las APC. Estas moléculas

interaccionan entre sí o con otros ligandos reforzando la unión entre el receptor de las células T y el complejo MHC-péptido, incrementando así la adherencia intercelular y su afinidad ².

Un factor de transcripción muy importante, que tiene funciones muy amplias y que desempeña un papel fundamental en muchas respuestas celulares a cambios ambientales, es el factor nuclear kB (NF-kB). NF-kB se identificó como regulador de la expresión del gen de la cadena ligera kappa de los linfocitos B murinos, pero se ha encontrado en muchos tipos de células. La forma inactiva de NF-kB es un heterodímero unido a IκB, que generalmente se compone de dos proteínas, las subunidades p65 y p50. NF-kB se activa por muchos de los factores que participan en la respuesta inflamatoria. Esta activación se produce por fosforilación de IκB y posterior traslocación que origina la expresión coordinada de diferentes genes que codifican proteínas, como citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en la iniciación y permanencia de la respuesta inflamatoria ⁸.

Tanto el sistema inmune innato (SII), como el adquirido (SIA), tienen la capacidad de diferenciar las células propias de los posibles invasores. Esta habilidad de detectar la invasión de microorganismos o antígenos, es fundamental para la defensa del hospedero, lo cual se logra mediante una familia de receptores. Los receptores del SII identifican estructuras moleculares presentes en un gran número de microorganismos denominado modelo molecular asociado a patógenos (pathogen associated molecular patterns, PAMP). Así cuando el hospedero detecta la presencia de PAMP, advierte la posibilidad de una agresión o infección y pone en marcha una serie de mecanismos que le permiten circunscribirla y eliminar a los posibles patógenos

(proceso inflamatorio) ⁹. Los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPR) están organizados para combatir contra intrusos externos. PAMPR detectan el antígeno y se encuentran ampliamente distribuidos en varias células de sistema inmune, como fagocitos, polimorfonucleares (PMN), monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, además de la mucosa epitelial y células endoteliales. Estos receptores se dividen en secretados, endocíticos y generadores de señales de transducción que inducen la expresión de genes que intervienen en la respuesta inmune ¹⁰.

El ejemplo más representativo de receptores que generan señales para captar un PAMP son los denominados receptores de tipo “Toll” (Toll- like receptor, TLR), cuyo nombre “Toll” se debe a su semejanza con las proteínas transmembranas de las moscas *Drosophila* que les permiten mantener la polaridad dorso ventral ¹¹.

La mayoría de los tejidos expresa al menos un TLR. Las células del sistema inmune utilizan varios TLR diferentes para detectar diversos componentes de los microorganismos simultáneamente y así elaborar una respuesta más eficiente ¹¹. En mamíferos, se conocen al menos 13 TLRs con distintas especificidades para reconocer estructuras altamente conservadas de microorganismos patógenos, además de moléculas extrañas al huésped ¹². Por ejemplo, el primer grupo (TLR 1, 2, 4, 5 y 6) se encuentran en la membrana plasmática mientras que el segundo grupo (TLR 3, 7, 8 y 9) son intracelulares y están presentes en la membrana endosomal ¹³.

Los ligandos para TLR activan una serie de procesos intracelulares que culminan con la activación del factor nuclear kappa B (NF-KB). En esta vía actúa un adaptador de proteínas MyD 88 que activa una quinasa asociada con el receptor de interleuquina (IRAK) el que a su vez se asocia con TRAF 6 (TNF- receptor asociado al factor 6), activando dos vías de señalización: la mencionada NF-KB y JNK. Existe otra vía independiente de MyD88, que activa genes. Los factores de transcripción regulan la expresión de varios genes, entre los que se incluyen los necesarios para iniciar la inflamación cutánea: quimoquinas, citoquinas, péptidos antibacterianos como las defensinas y moléculas de adhesión ¹⁴.

Aunque los ligandos extracelulares son diferentes, los TLR emplean vías intracelulares similares a las utilizadas por los receptores de citoquinas, que también culminan con la translocación del NF-KB hacia el núcleo y la transcripción de genes que cumplen una función primordial en la inflamación ¹⁴.

Como se mencionó anteriormente, una de las propiedades fundamentales del sistema inmune radica en la capacidad de discriminar entre antígenos propios y no propios. Es así como los linfocitos maduros funcionalmente competentes son capaces de reconocer y responder a antígenos extraños, pero no pueden reconocer y/o responder a antígenos propios. A través del mecanismo de autotolerancia se impide la respuesta contra estructuras propias. Por lo tanto, cuando se pierde esta autotolerancia se producen reacciones inmunes contra los antígenos propios, reacciones denominadas de autoinmunidad y las patologías que ellas causan se denominan enfermedades autoinmunes ¹⁵.

La enfermedad autoinmune se produce cuando existe una anormal interacción de los linfocitos T y B con el autoantígeno provocada por una irregularidad de la actividad de las células T helper y T reguladoras. Por lo tanto, un exceso de actividad helper o una disminución de actividad reguladora pueden dar inicio a la reacción autoinmune. Este desbalance clonal es probablemente modulado por factores virales, genéticos y medioambientales ¹⁶.

Las enfermedades autoinmunes se clasifican clásicamente en: sistémicas y órgano específicas. Entre las primeras se incluyen las que afectan a gran número de órganos y se asocian a menudo a hiperactividad de linfocitos B y a un número amplio y variado de autoanticuerpos. En este grupo destacan: Lupus eritematoso sistémico, Artritis reumatoide, Esclerodermia, Dermatomiositis y Polimiositis. En las enfermedades autoinmunes órgano específicas, los autoanticuerpos se dirigen específicamente contra un órgano o un tipo celular concreto de un órgano determinado. Un ejemplo de este tipo de enfermedad es la Tiroiditis de Hashimoto que afecta directamente a la glándula tiroides ¹⁶.

La tiroides es una glándula endocrina de origen endodérmico que se desarrolla precozmente en la porción cefálica del tubo digestivo. Está situada en la región cervical, por delante de la tráquea y está constituido por dos lóbulos unidos por un istmo¹⁷. La disposición celular en esferas que limitan el coloide, forma estructuras conocidas como folículos tiroideos. El epitelio folicular tiroideo reposa sobre una lámina basal. Estas células presentan las características ultraestructurales que indican que sintetizan, reabsorben y digieren proteínas (retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, vacuolas citoplasmáticas) ¹⁸.

La tiroides es la única glándula endocrina que acumula su producto de secreción en cantidad apreciable. Esta secreción llamada coloide tiroideo, está constituido principalmente por una glucoproteína de elevado peso molecular (660KD), denominada tiroglobulina. Gracias a la acción de la peroxidasa tiroidea (TPO), próxima a la membrana apical, el yodo se oxida y se une rápidamente a los restos aminoácidos de tirosina que forman parte de la tiroglobulina. La yodación de la tirosina y el acoplamiento de los derivados yodados, catalizado igualmente por TPO, dará lugar a las hormonas tiroideas, que permanecen unidas a la tiroglobulina. El coloide, del que forma parte la tiroglobulina, que contiene a su vez las hormonas tiroideas, es captado a la célula por pinocitosis en forma de pequeñas gotitas y transportado hacia la membrana plasmática basal, próxima al capilar sanguíneo. Las vesículas pinocíticas se fusionan con lisosomas que contienen enzimas (proteasas) que liberan los diferentes derivados yodados y las hormonas activas, parte de las cuales se vierten al torrente circulatorio ¹⁹.

La secreción de hormonas tiroideas (T3 y T4) está controlada por factores tróficos secretados tanto por el hipotálamo como por la adenohipófisis. La disminución de los niveles de T3 y T4 estimula la liberación de hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el hipotálamo y, por tanto, de la hormona estimulante del tiroides (TSH) en el lóbulo anterior de la hipófisis, lo cual se traduce en una elevación en los niveles de T3 y T4. A su vez esta elevación de las hormonas tiroideas inhibe la secreción tanto de TRH como de TSH, generando de esta manera un circuito de retroalimentación negativa ¹⁹.

Dentro de las enfermedades tiroideas autoinmunes más comunes encontramos la tiroiditis de Hashimoto (TH), cuyo nombre deriva del trabajo publicado en 1912 por ese autor, en el que describía a pacientes con bocio e intensa infiltración linfocitaria de

la tiroides ²⁰. La TH es una enfermedad autoinmune órgano específica, mediada tanto por factores celulares como humorales predominando el defecto fundamental a nivel de células T principalmente CD4+. El primer evento se inicia con un aumento de las células presentadoras de antígenos, generalmente células dendríticas y macrófagos los cuales infiltran la glándula tiroides. Esta infiltración puede ser inducida por factores medioambientales, genéticos y endógenos los cuales pueden causar daño a la glándula tiroides originando autoantígenos que serán presentados en la superficie de las APC. Luego estos se dirigen al nódulo linfático donde interactuarán con linfocitos T autorreactivos y con linfocitos B induciendo así autoanticuerpos tiroideos dirigidos fundamentalmente contra tiroglobulina (Tg) ²¹.

Un modelo de este trastorno (TH) propone que las células T de los pacientes reconocen antígenos tiroideos procesados y asociados a alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) ²¹.

A través del desarrollo de la enfermedad, la tiroides muestra un aumento difuso de tamaño, aunque en algunos casos este aumento puede ser más localizado. La cápsula se mantiene intacta y la glándula aparece más bien delimitada de las estructuras adyacentes. El estudio microscópico demuestra una extensa infiltración del parénquima por un infiltrado inflamatorio mononuclear, formado por linfocitos pequeños, células plasmáticas y centros germinales bien desarrollados. Los folículos tiroideos son pequeños y se encuentran revestidos en muchas zonas por células epiteliales con un abundante citoplasma eosinófilo granular ²².

Los modelos animales que se utilizan en las investigaciones sobre la tiroides, ayudan al estudio de los mecanismos patogénicos que conducen a la presentación de los desórdenes de esta glándula, dando la oportunidad de explorar nuevos tratamientos y formas de prevención ²².

El estudio de la tiroiditis de Hashimoto ha llevado a la inducción de esta patología de manera experimental, a través de la tiroiditis autoinmune experimental (EAT), la cual ha sido probada en diversos animales susceptibles al antígeno inyectado, induciendo la enfermedad mediante la inyección con tiroglobulina (Tg) acompañada de un coadyuvante ²³, lo cual genera el efecto característico de la TH descrita anteriormente. Esto ha contribuido extraordinariamente a un mejor acercamiento y comprensión de la biología celular de la misma y de los mecanismos patogénicos de las enfermedades tiroideas, de origen autoinmune o no, en el hombre, a pesar de que las manifestaciones clínicas e histopatológicas de éstas no se muestren exactamente igual en los animales ²⁴.

La relación que existe entre el sistema inmune y el neuroendocrino, mediado por hormonas, neurotransmisores y citoquinas ha permitido explorar distintas alternativas de tratamiento para las enfermedades autoinmunes. En diversos estudios se ha evaluado la importancia de la hormona hipofisiaria prolactina (PRL) y su función en el sistema inmune. Esta hormona peptídica se regula a nivel del hipotálamo y es secretada por la parte anterior de la hipófisis (adenohipófisis) encargada de estimular la producción de leche en las glándulas mamarias y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo, además de tener una función inmunoreguladora ²⁵.

Se ha demostrado que PRL estimula la proliferación linfocitaria, estimulando de este modo la respuesta inmune, mientras que sus propias acciones biológicas se hallan bajo el control de citoquinas capaces de modificar la concentración plasmática de PRL. Estos efectos recíprocos implican la presencia de receptores específicos para PRL, presentes en la membrana celular de numerosas clases de linfocitos y células accesorias. La unión de PRL a estos receptores estimula la síntesis y secreción de citoquinas linfocitarias y es un factor de crecimiento esencial para líneas celulares linfoides y células accesorias ²⁵.

Uno de los medicamentos mayormente utilizados en disminuir la secreción láctea y por lo tanto, los niveles de prolactina, es la bromocriptina (BCR). La BCR es un alcaloide semisintético derivado del ergot que interactúa con los receptores de dopamina D₂ y por lo tanto, actúa como agonista dopaminérgico D₂ y como antagonista parcial de D₁ ²⁶. Clínicamente, este medicamento reduce significativamente los niveles plasmáticos de prolactina en pacientes con prolactina elevada fisiológicamente, así como en pacientes con hiperprolactinemia ²⁷.

Además por su actividad dopaminérgica, bromocriptina es efectivo en la enfermedad de Parkinson en estado reciente y leve, como también en aquellos casos que muestran una respuesta deficiente o intolerancia a la L-dopa. No obstante, el uso más frecuente de este medicamento es para el tratamiento de la hiperprolactinemia, en la inhibición de la secreción de prolactina tanto espontánea como inducida por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), convirtiéndose en el estándar contra el cual se comparan los fármacos más nuevos ²⁸.

Se ha demostrado en experimentos que la bromocriptina induce comportamientos estereotipados a largo plazo en roedores y modifica el comportamiento en ratas con lesiones unilaterales en la sustancia negra ²⁷, sin embargo, no se han demostrado efectos directos sobre el sistema inmune.

La farmacocinética y metabolismo de bromocriptina en sujetos humanos se estudió con la ayuda de medicamentos marcados radiactivamente. En donde se observó que el 28% de la dosis oral (2.5mg) se absorbió por el tracto gastrointestinal. Experimentos *in vitro* han demostrado que el medicamento se une en 90-95% a albúmina sérica. La bromocriptina se metaboliza completamente previa a su excreción y posee una vida media de 4 a 15 hrs. La mayor vía de excreción del medicamento absorbido es la bilis ²⁶.

2. HIPÓTESIS.

Planteamos como hipótesis que la administración de distintas dosis de bromocriptina, es capaz de modificar la respuesta inmune frente al desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la tiroiditis autoinmune experimental (TAE).

3. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto que ejerce bromocriptina sobre el desarrollo de la respuesta inmune y la expresión de TLR-3 y TLR-4 en las células presentadoras de antígeno, durante el desarrollo de tiroiditis autoinmune experimental.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Inducir TAE en ratones experimentales tratados con distintas dosis de BCR.
- Medir los niveles de autoanticuerpos anti-Tg en el suero de los ratones de experimentación con TAE, a los cuales se les administraron distintas dosis de bromocriptina.
- Analizar el grado de activación del factor de transcripción NF-kB en células foliculares tiroideas, mediante inmunohistoquímica.
- Estudiar el efecto que ejerce BCR sobre la expresión de TLR-3 y TLR-4 en ratones experimentales y macrófagos J774.2, mediante inmunohistoquímica y RT-PCR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 con edades aproximadas entre 4 a 11 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos a una temperatura regulada de 22°C en cajas que contenían agua y alimento a libre disposición, en el vivero del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

5.2 Antígeno.

Se utilizó tiroglobulina purificada de cerdo (pTg), obtenida a partir de glándulas tiroideas de cerdos normales. Las tiroides fueron limpiadas cuidadosamente de los tejidos anexos y suspendidas en suero fisiológico para luego ser sometidas a homogeneización mecánica durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó a 9.000 g a una temperatura de 4°C por una hora. El sobrenadante obtenido se sometió a precipitación con sulfato de amonio al 33%, luego se procede a centrifugar a 9.000 g a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante nuevamente se precipita con sulfato de amonio saturado agregado gota a gota hasta alcanzar el 45% (este es el rango donde precipita la tiroglobulina) agitando durante 10 minutos, para luego volver a centrifugar a 9.000 g a 4°C por 30 minutos.

Se elimina el sobrenadante y el precipitado que contiene la Tg es resuspendido en 2 mL de buffer fosfato salino (PBS) pH 8,0 y posteriormente dializado con tres cambios de suero fisiológico durante un lapso de 24 horas a 4⁰C en agitación constante.

La concentración de Tg fue determinada mediante espectrofotometría a 280nm y finalmente almacenada a -20⁰C hasta su utilización. La pureza de la tiroglobulina se verificó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

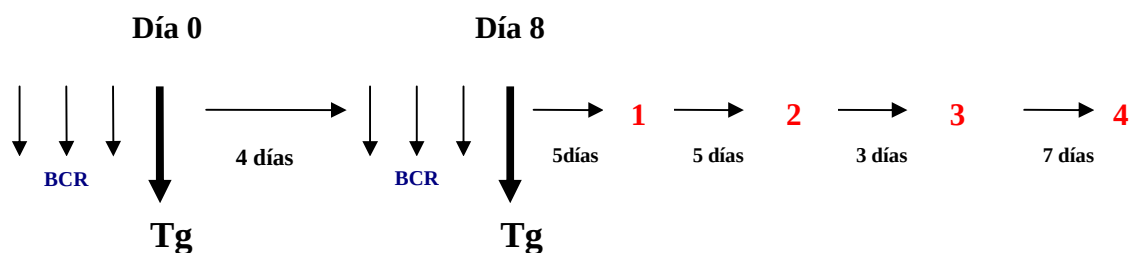
5.3 Disolución de Bromocriptina.

Se disolvieron 12 mg de Mesilato de Bromocriptina (2-Bromo-alfa-ergocryptine, Sigma, USA) en 1,776 mL de etanol puro. Una vez disuelto el fármaco se agregaron 12,444 mL de aceite de maíz con el fin de obtener una mezcla homogénea; obteniéndose una concentración de 0,844 mg/mL. A partir de esta concentración inicial se usaron dos dosis de BCR: una dosis mínima o baja de 0,94 mg/Kg y una dosis máxima o alta de 2,81 mg/Kg.

Los ratones experimentales pesaron entre 20 g a 30 g, por lo tanto, la cantidad de fármaco administrada varió entre 70 uL a 100 uL según el peso de cada ratón.

5.4 Tratamiento con bromocriptina a ratones experimentales.

El tratamiento se realizó de acuerdo al siguiente esquema, donde tanto la dosis mínima como la máxima señalada anteriormente se administran dos veces al día, tres días antes de cada inmunización:



1, 2, 3 = número de sangrados de los ratones experimentales.

4 = último sangrado y día de sacrificio de los ratones experimentales.

↓ = día de tratamiento de los ratones experimentales.

Además de los ratones experimentales tratados con bromocriptina, realizamos los siguientes grupos:

- Grupo control inmunizado sin tratamiento con bromocriptina.
- Grupo sin inmunizar tratado con altas dosis de bromocriptina.
- Grupo inmunizado tratado con el vehículo en que se disolvió bromocriptina.

Los grupos descritos siguen el mismo esquema señalado anteriormente, manteniendo los días inmunización, sangrados y sacrificio.

5.5 Inducción de Tiroiditis Autoinmune Experimental.

Para inducir tiroiditis autoinmune experimental a los ratones hembras se les administró al día cero 50uL de Tg + Coadyuvante Completo de Freund's (CCF) (Sigma, USA) vía subcutánea cuya concentración es de 1,2 mg/mL, (equivalente a 0,06mg de pTg/ ratón), al día ocho se administró una segunda dosis de antígeno, que consistió en 50uL de Tg + Coadyuvante Incompleto de Freund's (CIF) (Sigma, USA) por vía subcutánea.

5.6 Obtención de sueros de animales de experimentación.

Los sueros de los animales de experimentación fueron obtenidos mediante sangramiento, para lo cual se procedió a calentar a los ratones por un tiempo de 15 minutos aproximadamente en cámaras de madera con el fin de vasodilatar las venas caudales de los ratones. Posteriormente se realizó una incisión en la cola para obtener entre 10 a 15 gotas de sangre, la cual fue depositada en un tubo eppendorf de 2 mL. Luego se procedió a incubar la sangre en estufa a 37⁰C con el fin de apurar la retracción del coágulo y extraer el suero más fácilmente y libre de hemólisis. Posteriormente, se centrifugó el suero a 500 g por 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20⁰C hasta la utilización de los sueros.

5.7 Determinación de niveles de autoanticuerpos.

A partir de los sueros obtenidos de los ratones experimentales de los diferentes sangrados se llevó a cabo la determinación de niveles de autoanticuerpos anti- Tg a través de ELISA indirecto, para lo cual se utilizó una placa plástica de ELISA de 96 pocillos (Pierce Chemical Co). El procedimiento consistió primeramente en pegar el antígeno a la placa de ELISA, para lo cual se pegaron 100 uL tiroglobulina de ratón (mTg) a la base de cada pocillo en una concentración de 1 mg/mL en buffer carbonato – bicarbonato 0.05M pH 9.6 y se dejó incubar toda la noche a 4⁰C. Posteriormente se bloqueó la placa con leche descremada al 5% en PBS 1x; una vez pegado el antígeno, se bloqueó la placa con 100 uL de leche descremada al 5% en PBS 1x y se incubó durante 1 hora a 37⁰C.

Posteriormente se agregaron 100 uL / pocillo de los sueros obtenidos de los ratones experimentales (dilución 1:100 veces), dejándolos incubar durante toda la noche a 4⁰C. Después, se lavó la placa con 300 uL de PBS 1x – Tween 20 al 0,05% con el fin de eliminar los anticuerpos que no se unieron a los antígenos adheridos a la placa.

A continuación se agregó a cada pocillo, 100 uL de anticuerpo conjugado (anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa) en dilución 1/8000 con PBS 1x y se dejó incubar por 1 hora a 37⁰C. Nuevamente se lavó la placa con PBS 1x – Tween 20 al 0,05%.

Finalmente, se adicionó 100 uL / pocillo de sustrato (1mg de tetrametilbencidina (TMB) T3405 (Sigma Chemical Company, USA) el cual se disolvió en 10 mL de buffer fosfato citrato 0,05M y pH 5,0, en seguida se agregaron 2,5 uL de peróxido de

hidrógeno), dejándola incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta obtener color. Se detuvo la reacción agregándole 50 uL de H₂SO₄ 2M, obteniendo la absorbancia a 450 nm de cada pocillo.

5.8 Determinación de niveles de prolactina.

A partir de los sueros obtenidos de los ratones experimentales de los diferentes sangrados se llevó a cabo la determinación de niveles de prolactina a través de ELISA competitivo, para lo cual se utilizó una placa plástica de ELISA de 96 pocillos (Pierce Chemical Co). Primeramente, se pegaron 100 uL de prolactina pura (Luteotropic Hormona from sheep pituitary glands. Sigma) a la base de cada pocillo en una concentración de 10ug/mL en buffer carbonato – bicarbonato 0,05M pH 9,6 y se dejó incubar a 4⁰C durante toda la noche. Luego se bloqueó cada pocillo de la placa con 100uL de leche descremada al 5% en PBS 1x durante 1 hora a 37⁰C. Se lavó la placa tres veces con 300uL de PBS 1x – Tween 20 al 0,05%.

Posteriormente se adicionaron 100 uL de la mezcla 1:1 de anticuerpos anti-prolactina de oveja en conejo (1:500) + prolactina pura en concentraciones conocidas (500ng/mL; 1000ng/mL; 1500ng/mL; 2000ng/mL; 4000ng/mL; 8000ng/mL; 10000ng/mL) para curva estándar.

Para las muestras, en los siguientes pocillos, se agregaron 100uL de la mezcla 1:1 de anticuerpos anti- prolactina de oveja en conejo (1: 500) + pool de sueros de los ratones experimentales unidos según pauta de tratamiento en dilución 1:5 con PBS

leche al 0,05%, para determinar su concentración a partir de la curva. En seguida se incubó toda la noche a 4°C.

Se lavó la placa tres veces con 300 uL de PBS 1x – Tween 20 al 0,05% y posteriormente se agregó a cada pocillo 100 uL de anticuerpo anti- IgG de conejo conjugado a peroxidasa en una dilución 1: 500 y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C. Luego se volvió a lavar la placa tres veces con 300 uL de PBS 1x – Tween 20 al 0,05%.

Finalmente se agregó 100 uL de sustrato que consistía en 2 mg de ortofenildiamino (OPD) (Sigma, USA); 5 mL de buffer fosfato citrato 0,05 M pH 5.0; 6 uL de H₂O₂. Posteriormente se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta obtener color, en seguida, se detuvo la reacción agregándole 50 uL de H₂SO₄ 2M y la absorbancia se leyó a 492 nm sin blanco.

5.9 Obtención de tiroides.

Para la obtención de las tiroides de los diversos grupos experimentales se sacrificaron los animales mediante inhalación de éter etílico puro (Equilab. Santiago, Chile). Una vez extraídas las tiroides fueron almacenadas en nitrógeno líquido para su posterior utilización.

5.10 Cortes de tejido.

Se realizaron los cortes de las tiroides mediante crióstato utilizando para ello medio de congelación (OCT, Sakura, USA) generando bloques sólidos que permitieron efectuar los cortes a una temperatura de -22°C . Los cortes fueron adheridos a portaobjetos xilanizados (2% de 3- amino- propil- trietoxi- xilano (APES) (Sigma) en acetona pura (Equilab. Santiago, Chile) y mantenidos a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se almacenan los portaobjetos a -20°C para su posterior utilización en tinción con Hematoxilina – Eosina e Inmunohistoquímica.

5.11 Inmunohistoquímica.

Los portaobjetos con los cortes de tiroides fueron humedecidos con buffer fosfato salino (PBS 1x) pH 7.0. En seguida se bloqueó el tejido con PBS 1x/ H_2O_2 al 3% durante 15 minutos con el fin de eliminar el peróxido endógeno que contienen los cortes de tiroides. Posteriormente se fijó con paraformaldehído (PFA) / Tritón 100x durante 30 minutos. Con el fin de desenmascarar antígenos de los tejidos, se colocaron los portaobjetos en coplin con buffer fosfato – citrato 1mM hasta llenar las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente y calentamos en horno microondas por 5 minutos a una potencia de 500 watt y a una temperatura entre 70°C – 75°C , lo cual se repitió dos veces. Posteriormente se removió el recipiente del horno microondas se dejó enfriar durante 15 minutos y lavamos los portaobjetos dos veces dejándolos 10 minutos en PBS 1x cada vez.

Se bloqueó con leche descremada al 1% durante 30 minutos. En seguida, se retiraron los portaobjetos del coplin y se agregaron 50 μL de anticuerpos anti- TLR-3 (M

300, T -17. Santa Cruz Biotechnology, USA), anti – TLR-4 (L- 14. Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti – NF-kB (p65. Santa Cruz Biotechnology, USA) en diluciones 1:25 y 1:100 a diferentes tejidos de tiroides incubándolas en cámara húmeda durante toda la noche a 37⁰C. Posteriormente, se lavó dos veces con PBS 1x y una vez con Tween 20 y se agregó el segundo anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluído 250 veces en PBS 1x, utilizando para T -17 y L- 14 anti - IgG de cabra y para M 300 y p65 anti – IgG de conejo la cual se dejó incubando durante 1 hora en cámara húmeda. Finalmente se agregó a cada corte de tiroides 50 uL de sustrato, obtenido de la mezcla de 5 mL diaminobenzidina 1mg/mL, 50uL de H₂O₂, dejando reaccionar por 5 minutos a 37⁰C hasta obtener color. Posteriormente los portaobjetos se dejaron secar y fueron cubiertos agregando permout junto con un cubreobjeto.

5.12 Cultivo de macrófagos J774.2

Durante los distintos ensayos experimentales se utilizó la línea celular de macrófagos J774.2 (ATCC, USA), que corresponde a macrófagos murinos obtenidos de células de sarcoma reticular. Dentro de las características que presentan está su activa fagocitosis dependiente de anticuerpos, sintetizan grandes cantidades de lisozimas e IL-1. Los macrófagos fueron cultivados con 10mL de RPMI-1640 completo (Sigma Chemical Co., USA) utilizando botellas de cultivo celular estériles de 25cm² (Corning Costar Co., USA), incubadas a 37⁰C de temperatura en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ y una humedad de 96%, para tal efecto se utilizó un incubador de cultivos celulares (Heraeus D-6450, Hanau, Denmark). Todo el proceso de cultivo fue realizado bajo estrictas

medidas de asepsia, para lo cual se utilizó una cámara de flujo laminar horizontal (Nuair UN-201-630, Plymouth, USA), material autoclavado, etc.

5.13 Tratamiento de macrófagos J774.2 con bromocriptina y prolactina.

Las células J774.2 contenidas en las botellas de cultivo celular estériles fueron raspadas con una varilla estéril; en seguida se tomaron 3 placas petri en donde a cada una de éstas se le agregó 5 mL del raspado de macrófagos y 3 mL de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., USA) posteriormente se incubó por 48 horas para que los macrófagos se adhieran a las placa.

A continuación se realizó el siguiente tratamiento: para inmunocitoquímica a la primera placa petri se agregó 20uL de bromocriptina (5mg/mL) y a la segunda placa petri 20 uL de dimetilsulfóxido (DMSO) como control. Para RT - PCR a la primera placa se le agregó 50 uL de bromocriptina (300ug/mL), a la segunda placa 50 uL de medio completo RPMI- 1640 (Sigma Chemical Co., USA) como control y a la tercera placa 50uL de prolactina (2,06mg/mL), las cuales se incubaron por 24 horas en estufa a 37⁰C en condiciones estériles. Finalizado el período de incubación las células se obtienen para inmunocitoquímica y RT – PCR.

5.14 Inmunocitoquímica.

Las células se desprendieron de las placas usando una varilla estéril y se depositaron en tubos falcon estériles de 15 mL, luego se centrifugó durante 7 minutos a 1000 g, el sobrenadante se eliminó y el sedimento de células se resuspendió en 1 mL de PBS 1x. En seguida, se agregaron 9 mL de PBS 1x y se volvió a centrifugar durante 7 minutos a 1000 g, nuevamente se eliminó el sobrenadante y al sedimento de células se le adicionó 200 uL de PBS 1x de cuyo concentrado de células se agregaron 10 uL a portaobjetos xilanizados en triplicado.

Los portaobjetos con las células fueron humedecidos con PBS 1x pH 7.0, en seguida se bloqueó el tejido con PBS 1x / H₂O₂ al 3% durante 15 minutos con el fin de eliminar el peróxido endógeno que contienen los macrófagos. Luego se fijó con paraformaldehído (PFA) / Tritón 100x durante 30 minutos. A continuación se bloqueó con leche descremada al 1% durante 30 minutos. En seguida retiraron los portaobjetos del coplin y se agregaron 50 uL de anticuerpos anti- TLR-3 (M 300, T -17), anti – TLR-4 (L- 14) y anti – NF-kB (p65) en diluciones 1:25 y 1:100 en cámara húmeda durante toda la noche a 37⁰C. Posteriormente, se lavó dos veces con PBS 1x y una vez con Tween 20, en seguida se agregó el segundo anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 250 veces en PBS 1x, utilizando para L - 14 y T - 17 anti - IgG de cabra y para M 300 y p65 anti – IgG de conejo lo cual se dejó incubando durante 1 hora en cámara húmeda.

Finalmente se agregó 50 uL de sustrato obtenido de la mezcla de 5 mL diaminobenzidina 1mg/mL, 50uL de H₂O₂, dejando reaccionar por 5 minutos a 37⁰C

hasta obtener color, en seguida los portaobjetos se dejaron secar y luego cubiertos agregando permout junto con un cubreobjeto.

5.15 RT – PCR.

5.15.1 Extracción de RNA.

Se recolectaron las células J774.2 tratadas con bromocriptina, prolactina y células control mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5-10 minutos, en seguida se lavaron dos veces con PBS 1x. Se resuspendieron las células en 2mL de medio RPMI 1640 completo y estéril y se cuantificaron las células en cámara Neubauer, se ajustó a una concentración de 5×10^6 células / mL con medio RPMI 1640 completo y estéril, a continuación las células fueron recolectadas por centrifugación a 3.200 g por 10 segundos se eliminó el sobrenadante y a las células sedimentadas se les agregó 1 mL de reactivo de Trizol (Invitrogen) por cada 5×10^6 células / mL.

Posteriormente se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, lo cual permite la completa disociación del complejo nucleoproteínas y se agregaron 200uL de cloroformo (Merck). Se mezcló en Vortex por 15 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente con el fin de precipitar las proteínas. A continuación se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos a 7°C , logrando separar dos fases, una superior con RNA y una inferior con DNA y proteínas.

Posteriormente en otro tubo eppendorf se separó 0,4 mL de la fase superior que contenía RNA total y se agregó 0,5 mL de isopropanol al 100% (Merck), se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g

durante 15 minutos a $2 - 8^{\circ}\text{C}$; el sobrenadante se eliminó y se lavó el precipitado una vez con 1 mL de etanol al 75% (Merck).

En seguida se colocó en vortex y centrifugó a 6.000 g por 5 minutos a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ dejando secar el tubo eppendorf al aire por 5-10 minutos cuidando de no secar por completo. Finalmente el precipitado se disolvió en 100 uL de agua libre de DNAsa desionizada con dietilpirocarbonato (DEPC; 0,1% de Sigma) y se incubó por 10 minutos a $55-60^{\circ}\text{C}$. Además se determinó la pureza del RNA mediante espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm y realizando el cálculo de la razón A_{260}/A_{280} que debía ser mayor que 1,8.

5.15.2 Obtención cDNA.

Una vez obtenido el RNA por Trizol, se generó cDNA usando el Kit ImProm II (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizó 1µg de RNA previamente cuantificado, 1µl de Oligo (dt) 15 primer y H₂O libre de nucleasas suficiente para 5µl, esta mezcla fue llevada a una temperatura de 70°C por 5 minutos y luego enfriado a 4°C para en seguida agregar; 0.5 mM dNTP; 3 mM MgCl₂; Improm-II™ 5x Reaction Buffer; y 0,25 unidades de Transcriptasa Reversa. Una vez agregado todos los componentes de la reacción fue llevada 42°C por 1 hora, luego a 70°C por 15 minutos y finalmente a 4°C . El cDNA es almacenado a -20°C hasta su uso.

5.15.3 PCR.

Las reacciones de PCR destinadas para evaluar la presencia de fragmentos de DNA específicos se realizaron utilizando la enzima Go Taq Green Master Mix 2x (Promega). En cada reacción de amplificación se utilizó 10 ng de DNA molde y 10 pmol de cada partidor (ver Tabla 1); dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM (cada uno); 2 mM $MgCl_2$; 1,5 mM (Taq); equivalente a 1,25 unidades enzimáticas, en un volumen de reacción de 25 μ L. La amplificación se realizó en Termociclador PTC – 150 con la siguiente secuencia:

Paso 1: 5 minutos a 94⁰C.

Paso 2: 30 ciclos de:

- 30 segundos a 94⁰C.

- 30 segundos a 50⁰C.

- 30 segundos a 72⁰C.

Paso 3: 10 minutos a 72⁰C.

Paso 4: se baja la temperatura a 4⁰C.

TLR-3	sense: 5' GCC TCT TCG TAA CTT GAC CA 3' antisense: 5' GGC AAT ACT TTC ACA CGT GC 3'	457 pb
TLR-4	sense: 5' GGG TCA AGG AAC AGA AGC A 3' antisense: 5' TGA AGG CAG AGG TGA AAG C 3'	390 pb
Gapdh	sense: 5' CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC 3' antisense: 5' GCC TGC TTC ACC ACC TTC TT 3'	348 pb

Tabla 1. Secuencia nucleotídica (bp) de los diferentes partidores utilizados en las reacciones de amplificación mediante PCR.

5.15.4 Electroforesis en geles de agarosa.

Para evaluar los productos PCR se utilizaron geles de agarosa al 1,5%, los cuales fueron preparados con 0,75 g de agarosa (Lafken) disuelta en 50 mL de buffer de corrida TBE 1x y fueron teñidos con una solución estándar de bromuro de etidio (10 mg/mL; Lab. Winkler Ltda.). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen requerido de tampón Blue II (6x) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a una diferencia de potencial constante de 90 V. Las bandas de DNA presentes en los geles se visualizaron en transluminador de luz ultravioleta (TCP-20.M; Vilber Lourmat) y como forma de documentar el resultado, estos fueron fotografiados (Cámara fotográfica, EPSON).

6. RESULTADOS.

6.1 Inducción de tiroiditis autoinmune experimental (TAE) en ratones (hembras) tratados con distintas dosis de bromocriptina (BCR).

6.1.1 Análisis histológicos.

Para evaluar el desarrollo de TAE, se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6, clasificando en adultos a aquellos ratones de 11 semanas de edad y en jóvenes aquellos de alrededor de 6 semanas de edad. Tres días antes de cada inmunización (día 0 y día 8), se trataron a los grupos de ratones experimentales con dosis baja (0,94 mg/kg) y dosis alta (2,81 mg/kg) de bromocriptina, administrada dos veces al día.

Al día 28 del experimento se extrajeron las tiroides y se realizó tinción de hematoxilina – eosina obteniendo los resultados que se muestran en la figura 1. Podemos ver el estado de los cortes histológicos de la glándula tiroides de los animales inmunizados con Tg sin previo tratamiento con BCR y aquellos animales que fueron tratados con dosis bajas y altas del fármaco en cuestión. Podemos observar que la unidad estructural de la glándula tiroides corresponde al folículo tiroideo, compuesto de una monocapa de células epiteliales y el producto de su secreción es el coloide. El coloide es químicamente anfotérico, debido a que se tiñe tanto con colorante ácidos como la eosina y básicos como la hematoxilina.

Observamos que los cortes histológicos del grupo cuyos ratones no han sido tratados con BCR (Fig. 1E), presentan un evidente daño en la glándula producto de la

TAE, se observa destrucción de estructuras foliculares, focos de infiltración linfocitaria mononuclear, engrosamiento de epitelio folicular; en comparación con aquellos cortes histológicos de los ratones que sólo han sido tratados con BCR, se observa un tamaño regular de los folículos tiroideos, no se evidencian focos de infiltración, no hay destrucción de folículos (Fig. 1F). Además, se observan diferencias histológicas según la dosis administrada de bromocriptina, como también según la edad de los ratones; en el grupo A el cual corresponde a ratones jóvenes tratados con bajas dosis de BCR, se evidencia un tamaño folicular uniforme, epitelio folicular bien definido sin engrosamiento, pequeños focos de infiltración (Fig. 1A); el grupo B el cual corresponde a ratones adultos tratados con bajas dosis de BCR, se observa infiltración focalizada linfocítica mononuclear, epitelio folicular plano (Fig. 1B); el grupo C el cual corresponde a ratones jóvenes tratados con altas dosis de BCR, podemos ver pequeños focos de infiltración linfocítica mononuclear, pérdida de la uniformidad de los folículos, epitelio folicular plano (Fig. 1C); el grupo D el cual corresponde a ratones adultos tratados con altas dosis de BCR, presenta una mayor cantidad de focos de infiltrado linfocítico-mononuclear, engrosamiento del epitelio folicular, tamaño irregular de folículos tiroideos con cierto grado de destrucción folicular (Fig. 1D).

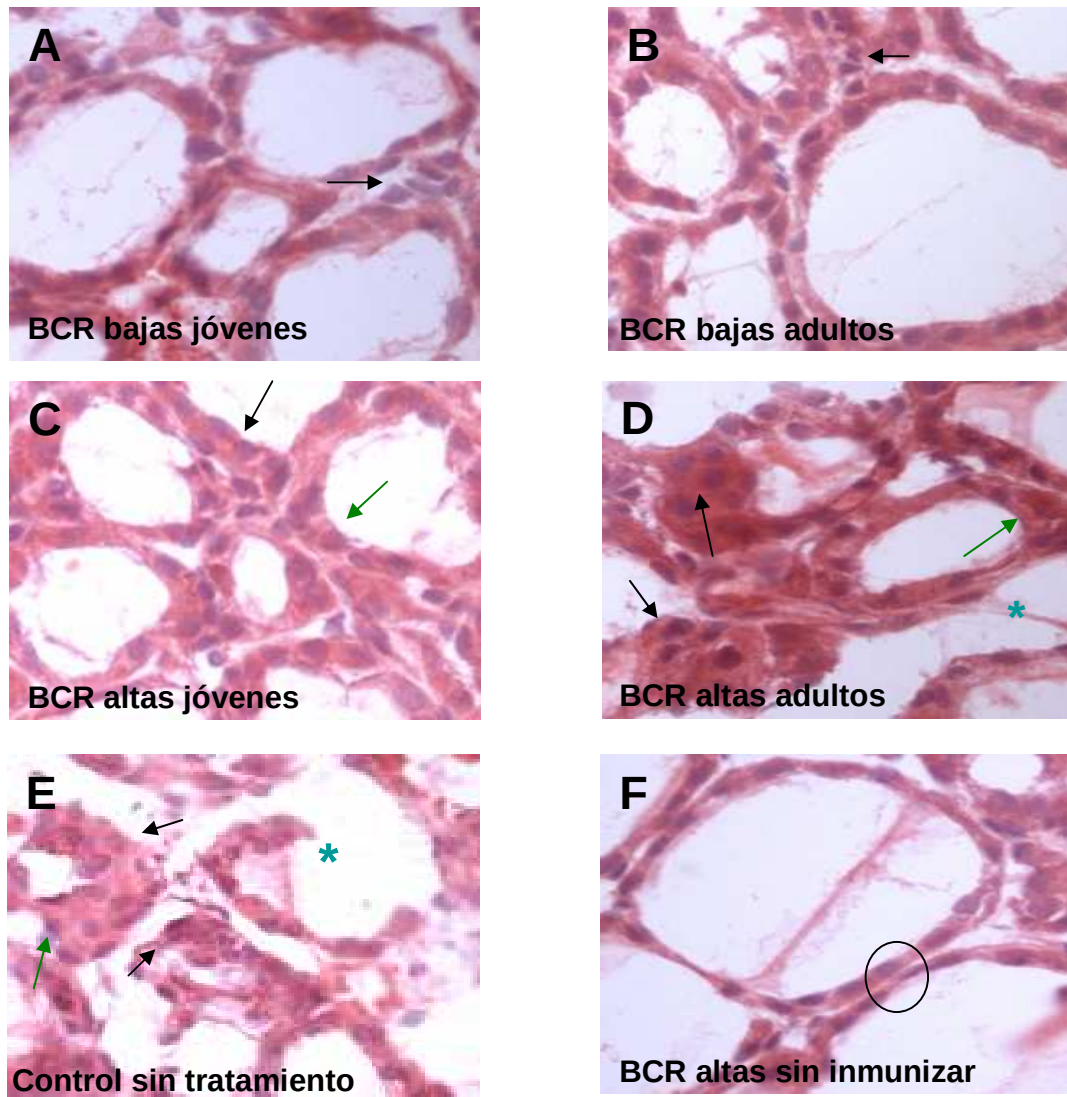


Figura 1. Tinción con hematoxilina – eosina de cortes histológicos de la glándula tiroides de ratones inmunizados con Tg y tratados con bromocriptina en altas y bajas dosis. (A: BCR bajas dosis ratones jóvenes; B: BCR bajas dosis ratones adultos; BCR altas dosis ratones jóvenes; D: BCR altas dosis ratones adultos; E: Control sin BCR; F: BCR altas dosis sin inmunizar). Imágenes en aumento 40x. Indicaciones: * Destrucción folicular, —> Infiltración linfocitaria mononuclear, —> Engrosamiento epitelial, ○ Epitelio folicular plano.

6.1.2 Autoanticuerpos anti – tiroglobulina (anti-Tg).

La determinación de los niveles de autoanticuerpos anti - Tg se realizó a partir de los sueros de los ratones experimentales obtenidos los días 5, 10 y 13 después de la segunda inmunización mediante ELISA indirecto. En la figura 2, se puede apreciar los distintos niveles de autoanticuerpos según el tratamiento aplicado a cada grupo, donde tanto los animales jóvenes como los animales adultos, tratados con dosis baja de BCR (0,94mg/Kg), al igual que los ratones jóvenes tratados con dosis alta de BCR (2,81mg/Kg), al día 5 post inmunización, presentan menores niveles de autoanticuerpos, que los ratones que no han recibido tratamiento. A su vez, se observa que los ratones experimentales no tratados con BCR los niveles de autoanticuerpos aumentan rápidamente hasta el día 13 post – inmunización, a diferencia de los grupos tratados con BCR cuyo aumento es más lento.

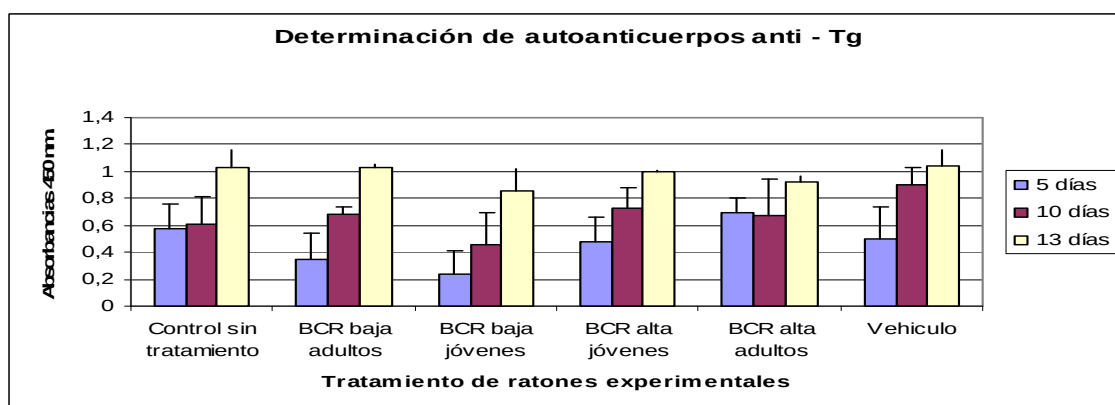


Figura 2. Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio para cada grupo de ratones experimentales, inmunizados con Tg en coadyuvante. Sueros obtenidos los días 5, 10 y 13 después de la segunda inmunización.

A continuación, en la figura 3 muestra un gráfico que permite analizar los niveles de autoanticuerpos del suero de los ratones experimentales adultos de 11 semanas de edad tratados con altas y bajas dosis de BCR en comparación con aquellos animales que no han sido tratados (control sin tratamiento), observando especialmente en aquellos ratones tratados con bajas dosis del fármaco un aumento paulatino de los niveles de autoanticuerpos hasta el día 21 post - inmunización, retrasando el comienzo de la respuesta inmune humoral de estos ratones; por otra parte, en aquellos ratones controles sin tratamiento podemos observar un aumento rápido de estos niveles de autoanticuerpos hasta el día 13 y luego al día 21 empiezan a disminuir estos niveles.

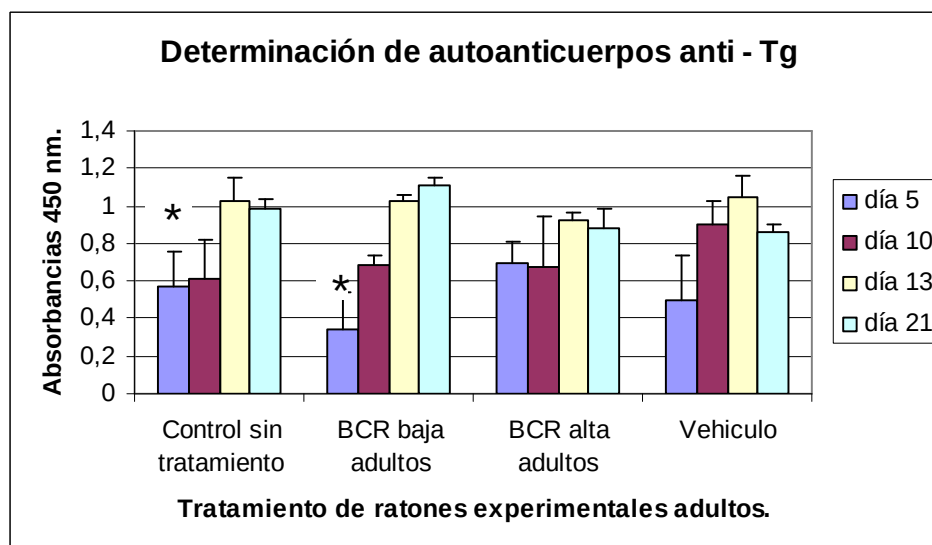


Figura 3. Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio de sueros de ratones experimentales adultos tratados con bajas y altas dosis de BCR, en comparación con sueros de ratones experimentales no tratados con BCR. Sueros obtenidos los días 5, 10, 13 y 21 después de la segunda inmunización.* $p < 0.05$.

La figura 4 muestra los niveles de autoanticuerpos anti – Tg en el suero de los ratones experimentales jóvenes de 6 semanas de edad aproximadamente que han sido tratados con altas y bajas dosis de BCR en comparación con los que no han sido tratados con BCR (sólo inmunizados) y aquellos que han sido tratados con vehículo, observándose en los día 5 y 10 post – inmunización un leve aumento en los niveles de autoanticuerpos en comparación con el control sin tratamiento y vehículo, especialmente en aquellos ratones tratados con bajas dosis del fármaco; al día 13 y 21, en el suero de los ratones tratados con BCR, los niveles de autoanticuerpos siguen aumentando, sin embargo, aquellos grupos no tratados, al día 21, comienzan a disminuir los niveles de autoanticuerpos.

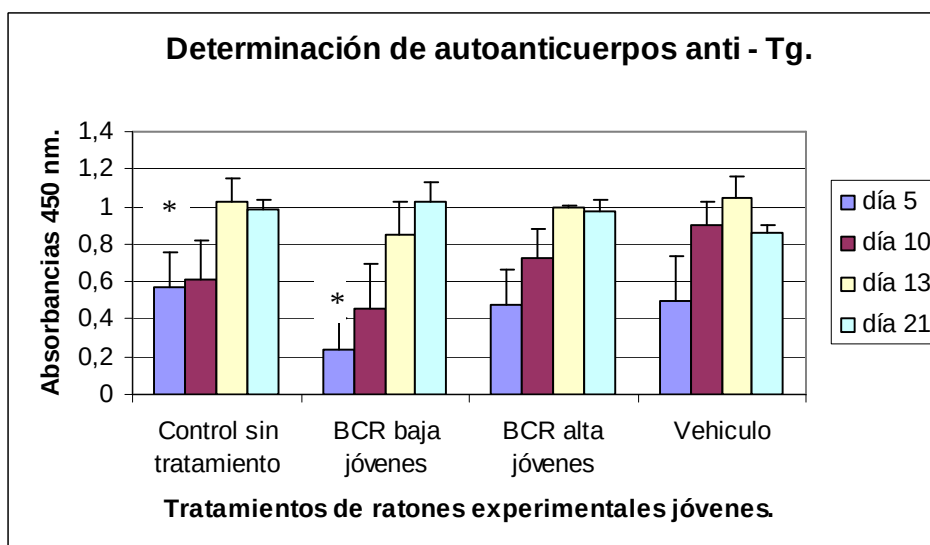


Figura 4. Niveles de autoanticuerpos anti – Tg expresados como absorbancia promedio de sueros de ratones experimentales jóvenes tratados con bajas y altas dosis de BCR, en comparación con sueros de ratones experimentales no tratados con BCR. Sueros obtenidos los días 5, 10, 13 y 21 después de la segunda inmunización. *p< 0.05.

Para observar claramente la diferencia existente entre los ratones experimentales tratados con BCR de aquellos no tratados con BCR y de aquellos tratados con vehículo e inmunizados, la figura 5 muestra que los niveles de autoanticuerpos en el suero de los animales tratados con BCR presentan una cinética ascendente hasta el día 21, donde los niveles de autoanticuerpos van aumentando lentamente a través del tiempo, por su parte, el suero de los ratones sin tratamiento con BCR presentan una cinética totalmente distinta, al día 5 y 10 los niveles de autoanticuerpos son mayores que con BCR los cuales continúan subiendo hasta el día 13 del experimento, luego al día 21 se observa un descenso de estos generado por la regulación de la respuesta inmune.

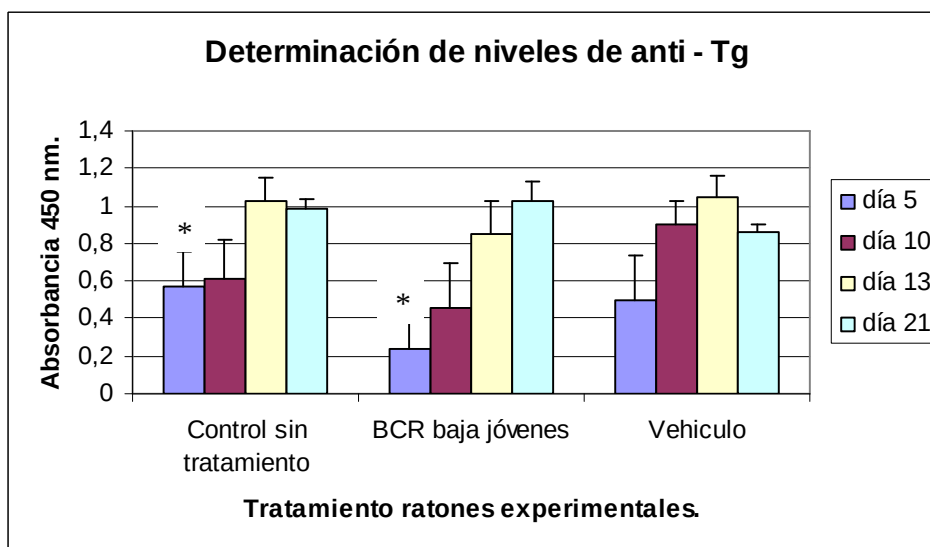


Figura 5. Niveles de autoanticuerpos anti – Tg en los sueros de los ratones experimentales sin BCR, con BCR y con vehículo. Sueros obtenidos los días 5, 10, 13 y 21 después de la segunda inmunización. * $p < 0.05$.

6.2 Niveles de prolactina (PRL) en pool de sueros de ratones tratados con bromocriptina.

La determinación de los niveles de prolactina se llevó a cabo a partir de un pool de sueros de los animales (n= 8) tratados con las distintas dosis de bromocriptina y con aquellos animales no tratados con bromocriptina, con el fin de tener un control de referencia. Esta determinación se realizó mediante un ELISA competitivo, el cual permitió generar una curva de calibración (figura 6) con el fin de extrapolar las absorbancias obtenidas de los sueros experimentales, para obtener las concentraciones y el porcentaje de inhibición (% de inhibición) de estos.

En la tabla 1 se observa el porcentaje de inhibición obtenido a partir de la curva de calibración (figura 6), el cual indica la cantidad de PRL suspendida en la muestra que es capaz de inhibir o impedir que el anticuerpo se una a la prolactina pegada en la base de la placa.

En la figura 7 se muestra un gráfico comparativo de la concentración de PRL en el pool de suero de los diversos grupos de ratones experimentales al día 5 después de la segunda inmunización, donde se observa una pequeña disminución en los niveles de PRL en los ratones tratados con BCR.

Absorbancia 490nm.	Concentración (ng/mL)	% inhibición
0,724	0	0
0,405	1000	44,1
0,394	1500	45,6
0,338	2000	53,3
0,250	4000	65,5
0,197	8000	72,8
0,141	10000	80,5

Tabla 1. Valores de absorbancia promedio a 490nm, concentración (ng/mL), % inhibición de la curva de calibración.

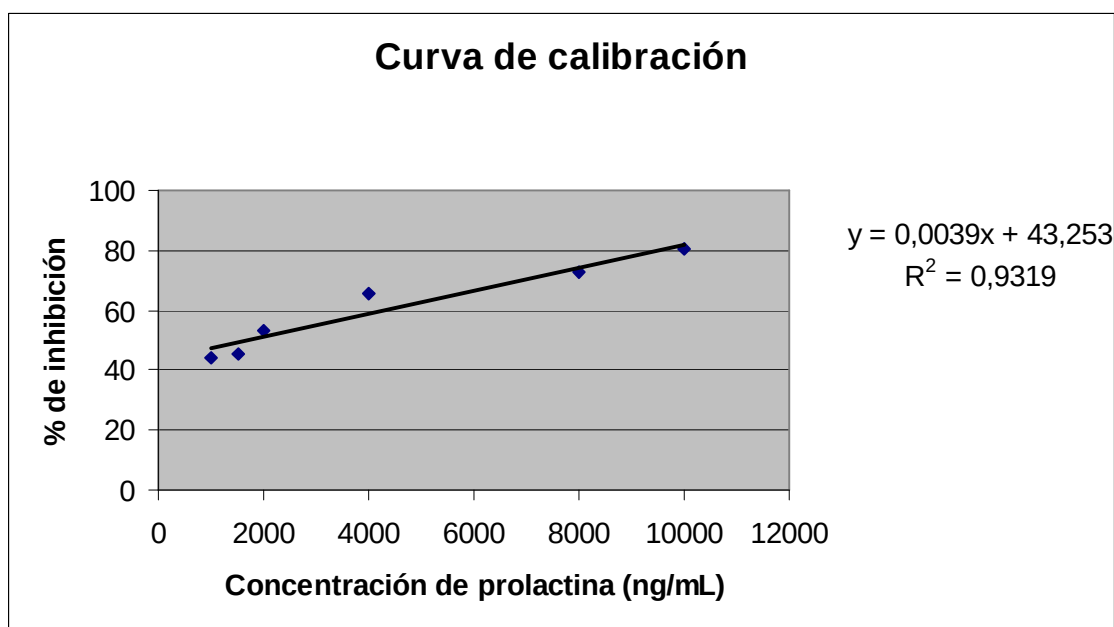


Figura 6. Curva de calibración: % inhibición v/s concentración de PRL.

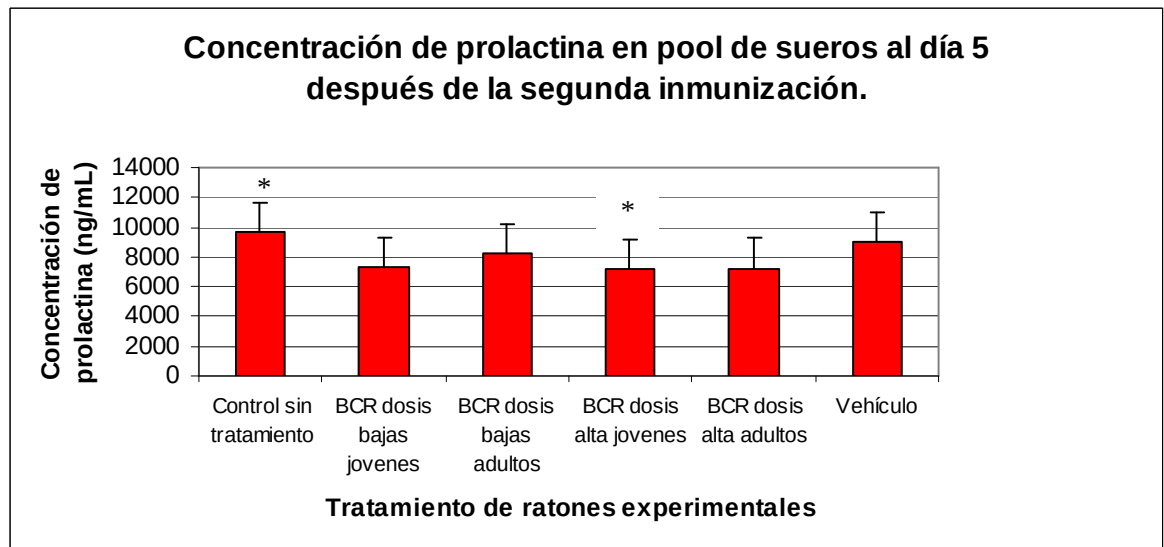


Figura 7. Niveles de PRL en pool sueros de ratones experimentales obtenidos mediante ELISA competitivo. * $p > 0.05$.

La figura 8 y 9 muestran gráficos que permiten observar las concentraciones de PRL según la edad de los ratones experimentales y tratamiento con dosis altas o bajas de BCR. En la figura 8, los pool de sueros de los ratones adultos que fueron tratados con dosis bajas y dosis altas de BCR, muestran una leve disminución de los niveles de PRL al día 5 post – inmunización, acentuándose esta disminución un poco más en aquellos animales tratados con altas dosis de BCR en comparación con aquellos ratones sin tratamiento.

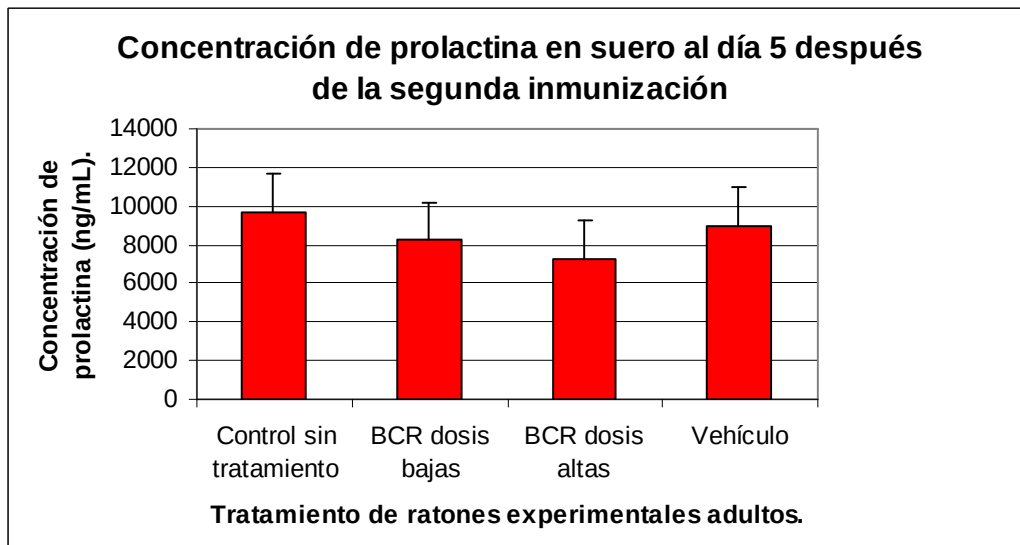


Figura 8. Concentración de PRL en pool de sueros de animales adultos tratados con altas y bajas dosis de BCR al día 5 post – inmunización.

En la figura 9, los pool de sueros de los ratones jóvenes que fueron tratados con dosis altas y bajas BCR presentan al igual que la figura anterior una leve disminución en los niveles de PRL al día 5 post – inmunización en comparación con los ratones no tratados, acentuándose esta disminución en el grupo tratados con altas dosis del fármaco. Lo cual indica que BCR es capaz de disminuir levemente los niveles de prolactina en los ratones experimentales jóvenes y adultos.

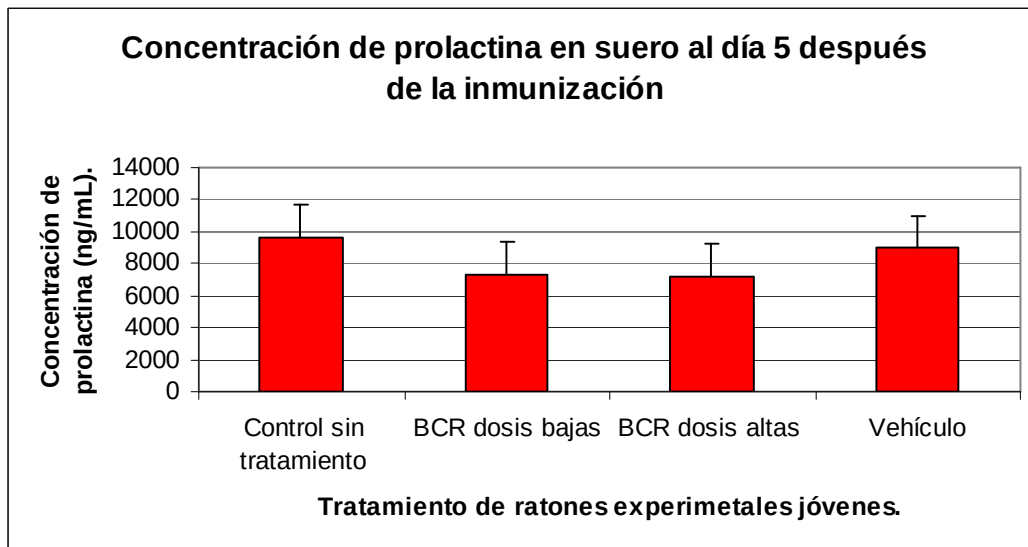


Figura 9. Concentración de PRL en pool de sueros de animales jóvenes tratados con altas y bajas dosis de BCR al día 5 post – inmunización. * $p > 0.05$

6.3 Expresión de p65 (NF- kB), TLR-3 y TLR-4 en el desarrollo de tiroiditis autoinmune experimental.

Con el fin de evaluar la expresión del factor NF- kB y los receptores TLR-3 y TLR-4 en la glándula tiroides, se realizaron cortes histológicos los cuales fueron sometidos a inmunohistoquímica según el protocolo establecido.

En la figura 10 se observa la expresión de p65, la cual corresponde a una subunidad proteica presente en la forma activada del factor de transcripción NF- kB, en los cortes histológicos de los ratones jóvenes tratados con BCR, mostrando una mayor tinción a nivel nuclear, indicado por la expresión de este factor en las células que rodean el folículo tiroideo y el espacio interfolicular, cuando se administran dosis altas y dosis bajas de BCR previo a la inmunización en comparación con aquellos ratones sin tratamiento con BCR.

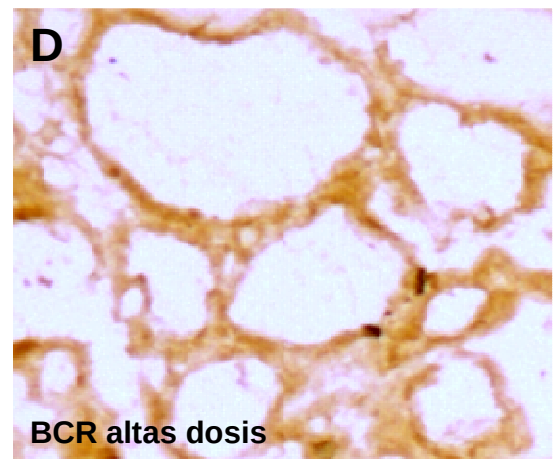
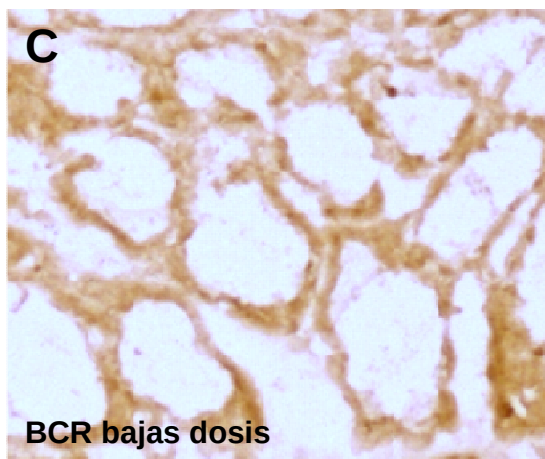
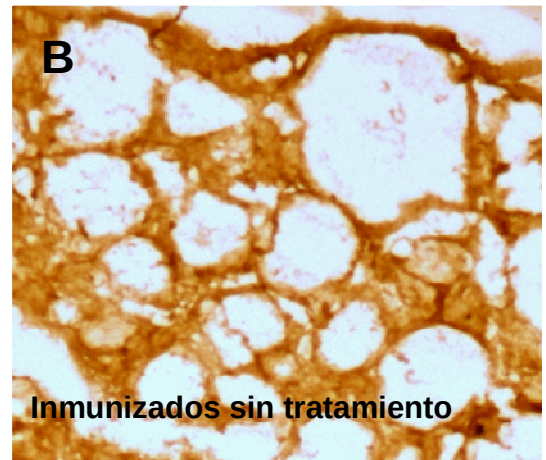
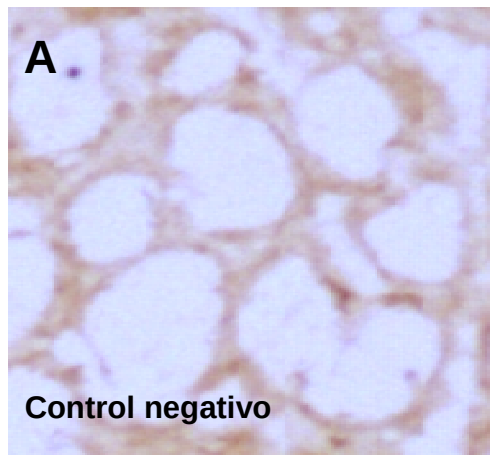


Figura 10. Expresión del factor NF- κ B en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR (A: Control negativo (sin anticuerpo); B: control positivo (con anticuerpo); C: BCR bajas dosis; D: BCR altas dosis). Imágenes en aumento 40x.

En la figura 11 se observa la expresión de TLR-3, en los cortes histológicos, tanto en el grupo de ratones jóvenes tratado con dosis bajas de BCR como en el grupo con dosis altas de BCR, lo cual se ve reflejado por una tinción más intensa de las células que rodean el folículo tiroideo, especialmente en el grupo tratado con altas dosis de BCR, en comparación con el corte histológico de los ratones inmunizados sin tratamiento, cuyas células se observan con una tinción más tenue.

En la figura 12 se observa la expresión de TLR-4 donde los cortes histológicos de los animales jóvenes tratados con BCR presentan una coloración de sus células foliculares más tenues a nivel de la membrana celular, especialmente a dosis bajas de BCR, en comparación con el corte histológico de los ratones inmunizados sin tratamiento. No obstante, tanto las dosis altas de BCR como las dosis bajas de BCR no reflejan mayores diferencias significativas entre ellas, salvo una mayor tinción de los folículos producto de una mayor adherencia del colorante a estas estructuras.

Por lo tanto, en las figuras 10, 11, 12 se observa que el grupo tratado con altas dosis de BCR presenta tanto para p65, TLR-3 y TLR-4 modificaciones en la expresión tanto de p65 como para los receptores en comparación con el control negativo y los ratones inmunizados sin tratamiento.

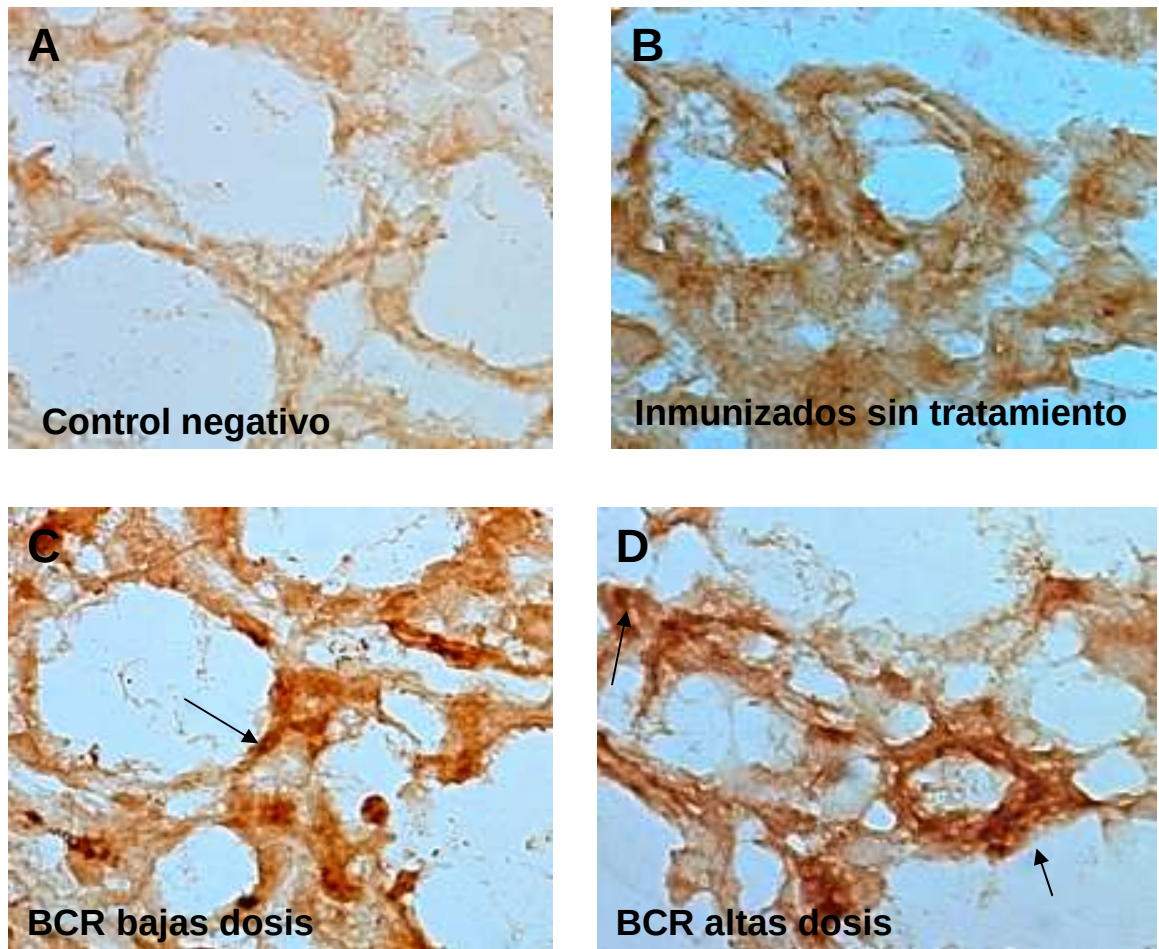


Figura 11. Expresión de TLR-3 en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR (A: Control negativo (sin anticuerpo); B: control positivo (con anticuerpo); C: BCR bajas dosis; D: BCR altas dosis). Imágenes en aumento 40x. Indicaciones: → Expresión de TLR-3.

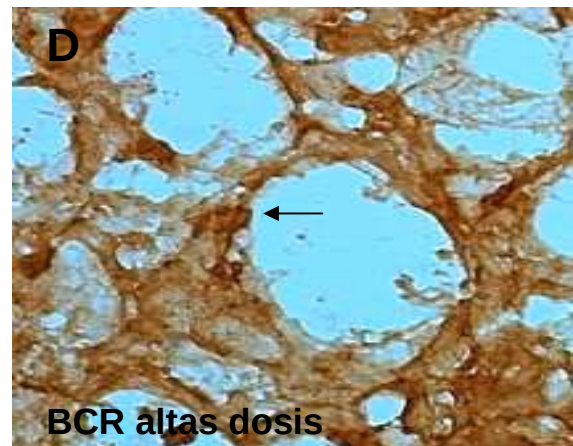
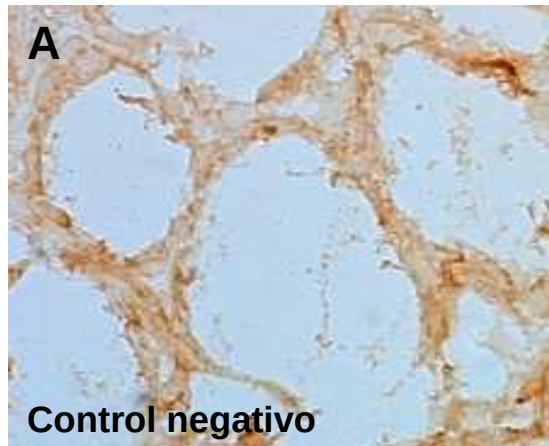


Figura 12. Expresión de TLR-4 en la glándula tiroides tras inducción de TAE y administración de distintas dosis de BCR (A: Control negativo (sin anticuerpo); B: control positivo (con anticuerpo); C: BCR bajas dosis; D: BCR altas dosis). Imágenes en aumento 40x. Indicaciones: —→ Expresión TLR-4.

6.4 Expresión de TLR-3, TLR-4 y p65 en cultivos celulares (J774.2) tratados con bromocriptina.

Con la finalidad de evaluar la expresión de TLR-3, TLR-4 y p65 en los cultivos celulares J774.2, se dividieron estas células en dos grupos: un grupo control y un grupo tratado con bromocriptina; los cuales fueron incubados en placas petri durante 24 horas a 37⁰C. Transcurrido el tiempo de incubación, se desprendieron las células y fueron aplicadas en portaobjetos xilanizados con el fin de llevar a cabo la inmunocitoquímica.

En la figura 13, se observa el resultado obtenido luego de tratar las células con bromocriptina y ser sometidas a inmunocitoquímica. La expresión de TLR- 4, de las células tratadas con BCR presentan una mayor tinción celular en comparación con las células control, lo cual está indicado por el aumento de la coloración en la membrana. Por otra parte, al visualizar la expresión de TLR-3 en las células tratadas con BCR, se observa un aumento de la tinción de estas células, lo cual está dado por una marcada coloración café a nivel del citoplasma en comparación con aquellas células controles. Por lo cual, tanto para TLR-3 como para TLR-4, se visualiza un aumento de la tinción en estas células.

En la figura 14, tanto para las células controles, como las tratadas con BCR, no se observan cambios significativos, respecto a p65, a nivel de tinción celular y por lo tanto, no se evidencia mayor activación de este factor a nivel nuclear.

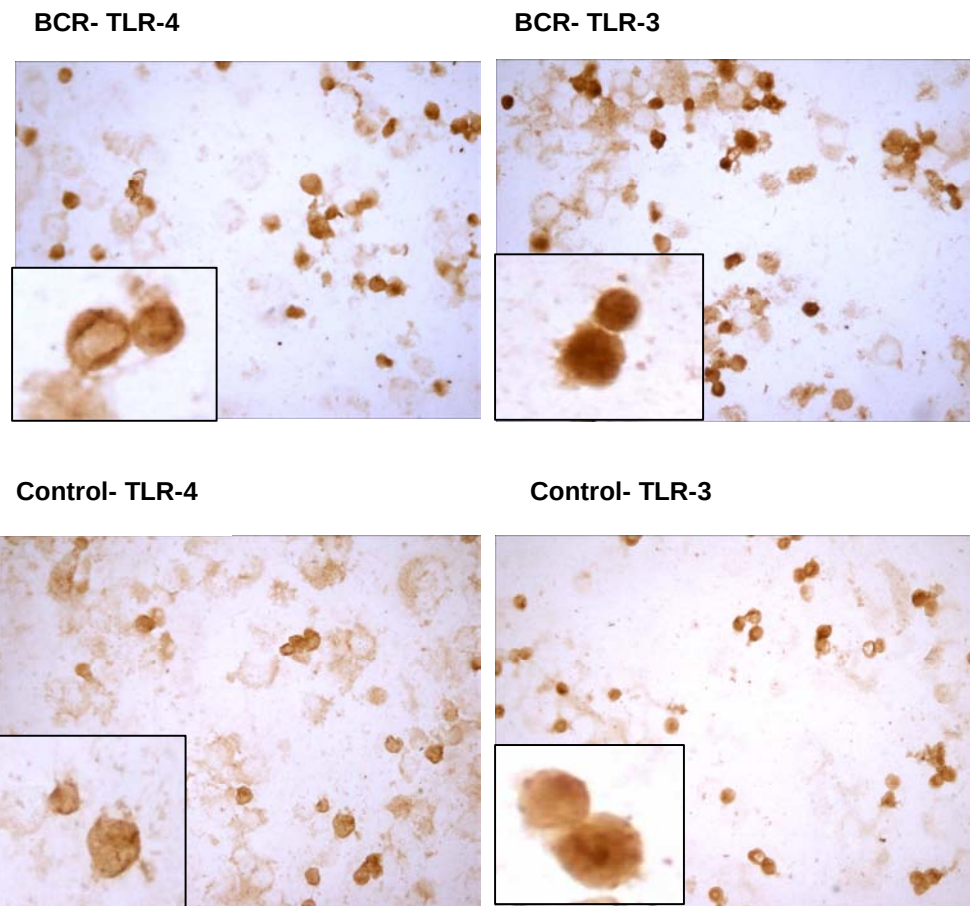


Figura 13. Expresión de TLR-3 y TLR-4 en líneas celulares J774.2 mediante inmunocitoquímica tras la administración de bromocriptina en comparación con grupos controles. Imágenes en aumento 10x.

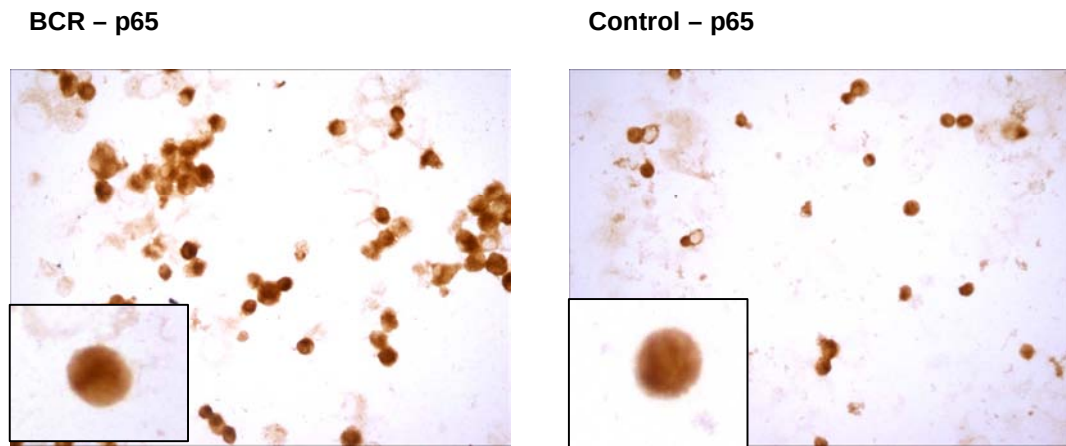


Figura 14. Expresión de p65 en líneas celulares J774.2 mediante inmunocitoquímica tras la administración de bromocriptina en comparación con grupo control. Imágenes en aumento 10x.

6.5 Expresión de mRNA para TLR- 3 y TLR- 4 mediante RT- PCR.

Para evaluar la expresión de mRNA se aisló el RNA con Trizol, posteriormente se obtuvo cDNA usando el sistema Improm II (Promega), la amplificación se realizó usando GoTaq Green Master Mix usando los primers descritos en materiales y métodos. La figura 15 muestra los resultados de la amplificación por RT- PCR del fragmento del gen de TLR- 3, proveniente de líneas celulares J774.2, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En esta figura podemos observar cuatro columnas, correspondientes a estándar, células tratadas con: prolactina (PRL), bromocriptina (BCR) y control respectivamente, en el carril con BCR se observa un leve aumento de la intensidad de la de la banda de 457 pares de bases (pb).

La figura 16 muestra los resultados de la amplificación por RT- PCR del fragmento del gen de TLR- 4, proveniente de líneas celulares J774.2, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. En esta figura podemos observar cuatro columnas, al igual que la figura 15, donde no se observan diferencias significativas entre las bandas.

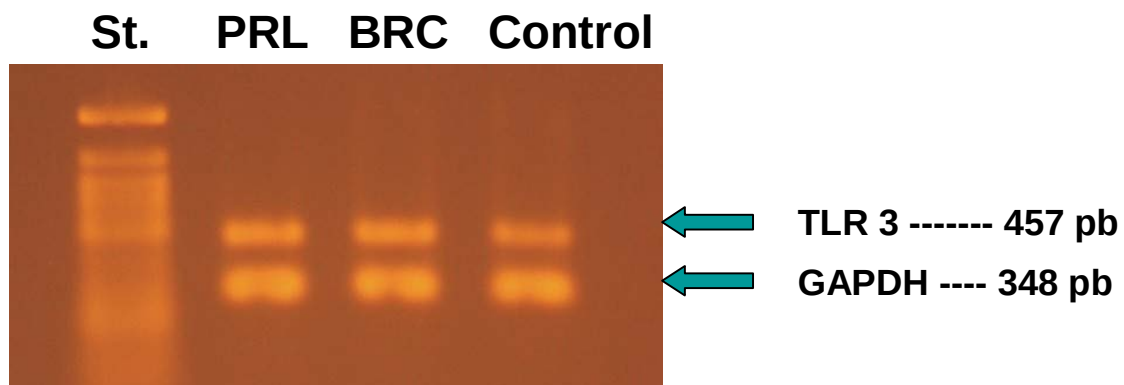


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del producto de RT-PCR del cDNA de TLR -3 en líneas celulares J774.2 tratadas con PRL, BCR y control (sin tratamiento).

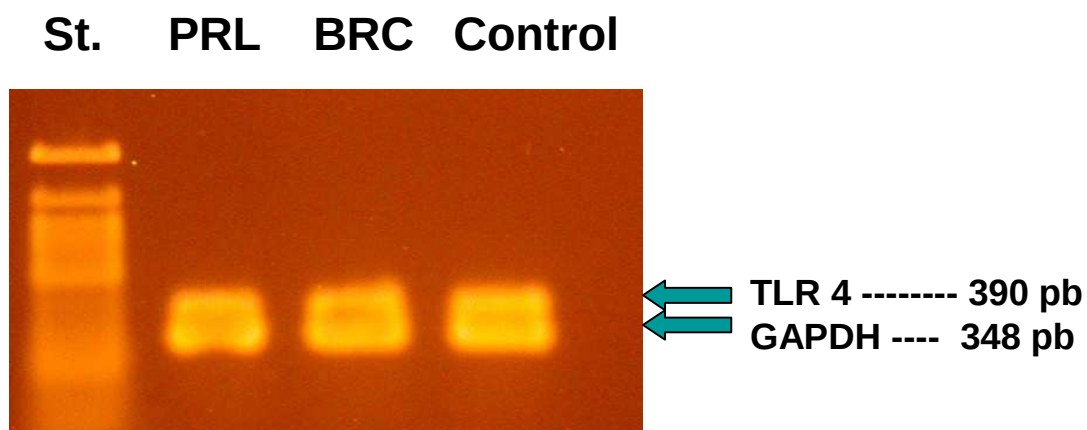


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del producto de RT-PCR del cDNA de TLR -4 en líneas celulares J774.2 tratadas con PRL, BCR y control (sin tratamiento).

7. DISCUSIÓN.

La tiroiditis autoinmune experimental (TAE) es un modelo experimental en ratones de tiroiditis de Hashimoto, una enfermedad órgano específica prototipo para el estudio de enfermedades autoinmunes ³³, caracterizada por la producción de autoanticuerpos tiroideos, destrucción folicular y por una infiltración linfocitaria mononuclear en la glándula tiroides ²³. Tiroiditis autoinmune experimental puede ser inducida mediante inyecciones con tiroglobulina (Tg) emulsificada con coadyuvante completo de Freund's (CCF) administrado por vía subcutánea en interior del muslo del ratón ²³.

En estudios genéticos se ha demostrado que la Tg es un antígeno que ha sentado las bases para entender la interrelación de los genes del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) con la TAE, tanto en los animales como en el hombre. Los principales modelos cuyas características histológicas semejan las encontradas en pacientes con Hashimoto derivan de los ratones ³⁴, haplotipo H2^k, H2^b ²³. En este trabajo experimental utilizamos ratones de la cepa C57BL/6, los cuales son reconocidos como ratones medianamente respondedores frente a un antígeno en particular ²³, debido a que estos ratones nos permiten observar los cambios que ocurren en las células foliculares sin perder de vista la integridad de la glándula tiroides y se pueden apreciar los niveles de autoanticuerpos (figura 1 y 5 respectivamente).

La bromocriptina (BCR) es un alcaloide semisintético derivado del ergot que actúa como agonista dopaminérgico D_2 inhibiendo la liberación de prolactina tanto espontáneamente como inducida por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) ²⁶. Es utilizada en trastornos del ciclo menstrual, esterilidad femenina, hiperprolactinemia, enfermedad benigna de mamas, enfermedad de Parkinson, entre otras ²⁹. Bromocriptina es un fármaco inhibidor de la producción de prolactina en la adenohipófisis ²⁶. Esta hormona participa en la modulación de la respuesta inmune mediante una interacción neuroendocrina ²⁶. Se decidió en este trabajo experimental utilizar a ratones C57BL/6 con diferentes dosis del fármaco, una semejante a la dosis utilizada en humanos (dosis baja) y otra superior, vía intraperitoneal, administradas diariamente durante tres días antes de cada inmunización con tiroglobulina en coadyuvante completo de Freund's (CCF). El efecto del tratamiento sobre los niveles de autoanticuerpos, a partir del suero de estos animales, se determinó mediante ELISA indirecto (figura 2) se observa la aparición de autoanticuerpos anti – Tg en todos los animales inmunizados, respondiendo adecuadamente al modelo experimental propuesto por la literatura. No obstante, los animales tratados con BCR comienzan lentamente a responder a la inmunización con Tg + CCF. Los animales jóvenes y adultos tratados con bajas dosis de bromocriptina presentan menores niveles de autoanticuerpos en los días 5 y 10 que aquellos tratados con altas dosis del fármaco (figuras 3 y 4), observando que la respuesta inmune humoral de los animales jóvenes tiene un inicio más lento que los animales adultos con las mismas dosis de fármaco en los primeros días de la enfermedad. Sin embargo, al día 13 los niveles de

autoanticuerpos para todos los grupos experimentales aumenta perdiéndose el efecto ejercido de la BCR sobre la respuesta inmune humoral.

Los niveles de autoanticuerpos en el suero de los animales tratados con BCR presentan una cinética ascendente hasta el día 21 (figura 5), donde los niveles de autoanticuerpos van aumentando lentamente a través del tiempo, especialmente, desde el día 5 al día 10. Por su parte, aquellos ratones sin tratamiento con bromocriptina presentan una cinética totalmente distinta, al día 5 y 10 los niveles de autoanticuerpos aumentan rápidamente, los cuales continúan subiendo hasta el día 13 del experimento, luego al día 21 se observa un descenso de estos; probablemente mediado por mecanismos de regulación de la respuesta inmune, lo cual nos indica que la bromocriptina puede retrasar el inicio de la respuesta inmune humoral.

Para analizar el efecto de bromocriptina sobre el daño tisular de la glándula tiroides, se realizó un análisis histológico mediante la tinción hematoxilina – eosina para evidenciar los patrones característicos de la TAE y las diferencias existentes entre los animales tratados con bromocriptina y los no tratados con el fármaco. Se muestra una marcada diferencia entre los diversos tipos de tratamiento aplicados a cada grupo experimental, se puede evidenciar que en el grupo al cual solamente se le administró bromocriptina en dosis altas vía intraperitoneal (figura1), no se desarrolla TAE debido a que este grupo no fue inmunizado con Tg + CCF; el grupo al cual se le administró Tg +CCF, presenta los patrones característicos del modelo experimental de TAE. No obstante, los grupos tratados con bromocriptina muestran diferencias según dosis y edades de los ratones experimentales. Los grupos que fueron tratados con bajas dosis de bromocriptina muestran pequeños focos de infiltración, especialmente en el grupo de

ratones jóvenes, prácticamente no se aprecia engrosamiento epitelial; sin embargo, al analizar los grupos tratados con altas dosis de bromocriptina, se observa un mayor grado de infiltración linfocítica mononuclear, irregularidad en el tamaño de los folículos tiroideos, engrosamiento del epitelio, especialmente en el grupo de ratones adultos, donde se aprecia marcadamente un aumento de la infiltración e irregularidad de los folículos; pudiendo observar que las alteraciones apreciadas en los grupos tratados con bromocriptina son mínimas, especialmente en los grupo tratados con bajas dosis de bromocriptina, a diferencia del grupo al cual solamente se le administró Tg + CCF . Lo cual indicaría que bromocriptina podría disminuir directamente la respuesta inmune, trayendo como consecuencia una disminución de la infiltración de linfocítica mononuclear y por lo tanto, un mayor equilibrio entre la actividad de las células T helper y las T reguladoras que forman parte de la respuesta inmune celular.

Se sabe que la prolactina (PRL) no sólo es producida por la adenohipófisis sino también por células del sistema inmune que además expresan receptores para PRL ³⁶. Se ha demostrado que la PRL estimula la producción de inmunoglobulinas y autoanticuerpos en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico y en sujetos sanos ³⁶. También se ha descrito que prolactina mantiene una marcada interacción con el sistema inmunológico; estimula la proliferación linfocitaria, estimulando de este modo la respuesta inmune, mientras que sus propias acciones biológicas se hallan bajo el control de citoquinas capaces de modificar la concentración plasmática de PRL. Estos efectos implican la presencia de receptores específicos para PRL, presentes en la membrana celular de numerosas clases de linfocitos y células accesorias ³⁷. Los efectos observados en los animales

tratados con bromocriptina podrían ser atribuidos al cambio en los niveles de prolactina. Para evaluar si el tratamiento con bromocriptina produciría cambios importantes en los niveles de PRL, medimos la concentración de prolactina en pool de sueros de ratones experimentales a través de ELISA competitivo (figura 7), en ella se aprecia como aquellos ratones tratados con bromocriptina disminuyen levemente sus niveles de prolactina al día 5 después de la segunda inmunización. A su vez, analizamos que la disminución de los niveles de prolactina es independiente de la edad de los ratones experimentales (figuras 8 y 9), debido a que no se apreciaron diferencias significativas entre los ratones jóvenes y los adultos. El efecto esperado de disminuir la respuesta inmune debido a la disminución de los niveles de prolactina por parte de bromocriptina, no es atribuible a PRL, debido a que se observa poco cambio en los niveles de PRL en el pool de suero de los ratones experimentales tratados con bromocriptina.

La literatura presenta varios aspectos que indican que las células foliculares tiroideas jugarían en la tiroiditis autoinmune un rol de células presentadoras de antígeno (APC), ya que en estas condiciones éstas células expresan, citoquinas, moléculas de adhesión, moléculas MHC de clase II, ya sea por acción de IFN- γ u otras citoquinas que permiten presentar el antígeno (Tg) a células T apropiadas, pudiendo generar una respuesta autoinmune ³².

Estudios anteriores a este trabajo experimental señalan que al inducir tiroiditis autoinmune experimental mediante inmunizaciones con Tg usando coadyuvante, provoca la activación de NF-kB en las células foliculares de la glándula tiroides ³⁰. El factor de transcripción NF-kB es una proteína dimérica, que en un principio fue identificado como un regulador de la expresión de los genes de la cadena liviana kappa

en linfocitos B murinos ³⁸. La forma inactiva de NF- κ B es un heterodímero, que generalmente se compone de dos proteínas, las subunidades p65 y p50, asociada a la proteína inhibitoria I κ B. NF- κ B se encuentra en el citoplasma y está unido a I κ B, lo que le impide penetrar en el núcleo. Cuando estas células se estimulan, diversas quinasas específicas fosforilan I κ B, produciendo su rápida degradación por proteosomas. La disociación de I κ B de NF- κ B origina el paso NF- κ B al núcleo, donde se une a secuencias específicas de las regiones promotoras de ciertos genes con lo cual se activa la transcripción ³⁹; por lo cual se decidió estudiar la expresión de este factor, y a su vez investigar si la administración de distintas dosis de bromocriptina en ratones alteran la expresión del factor NF- κ B. Se aprecia un aumento en la expresión de este factor en las células que rodean el folículo tiroideo y el espacio interfolicular (figura 10), cuando se administran distintas dosis de bromocriptina previo a la inmunización en comparación con aquellos ratones sin tratamiento con bromocriptina.

Tanto el sistema inmune innato (SII), como el adquirido (SIA), tienen la capacidad de diferenciar las células propias de los posibles invasores. Esta habilidad de detectar la invasión de microorganismos o antígenos, es fundamental para la defensa del hospedero, lo cual se logra mediante una familia de receptores; son los denominados receptores de tipo "Toll" (Toll- like receptor, TLR) ⁹, los cuales intervienen en el inicio de la respuesta inmune innata, son un verdadero puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido, esenciales para el reconocimiento de componentes patógenos e iniciar una respuesta inmune ¹¹.

Bacterias, virus y otros microorganismos son identificados como elementos extraños mediante el reconocimiento de sus patrones moleculares asociados a

patógenos por la familia de proteínas TLR, presentes en las células presentadoras de antígeno (Tabla 2).

Recientemente, estudios describen que en la mayoría de los pacientes que presentan tiroiditis de Hashimoto, la proteína TLR-3 se encuentra sobreexpresada alrededor de los tirocitos humanos, atribuibles a estimulación por agentes virales (mRNA)³¹.

En el presente trabajo se evaluó la expresión de TLR-3 y TLR-4, a partir de inmunohistoquímica, en los cortes histológicos de la glándula tiroides (figuras 11 y 12). Al analizar la expresión de TLR-3, en los animales inmunizados, se evidencia la expresión de estos receptores en las células foliculares. Posteriormente al analizar la expresión de TLR- 4, también se evidencia una expresión de éstos. Donde aquellos animales tratados con bromocriptina en distintas dosis se aprecian un leve aumento de esta expresión como se observan en las figuras 11 y 12.

Como una forma de observar si el efecto en nuestro modelo experimental se produce en forma directa por bromocriptina o indirectamente a partir de la disminución de prolactina, se realizó un estudio utilizando las células J774.2, que corresponden a líneas celulares de macrófagos murinos, las que fueron sometidas a inmunocitoquímica para evidenciar la expresión de TLR-3 y TLR-4, (figura 8). Las células tratadas con bromocriptina presentaron una mayor tinción de sus células, según las características específicas para TLR-3 y TLR-4. Para seguir analizando el efecto directo de bromocriptina, se utilizó el modelo de estimulación in vitro con líneas celulares de origen murino J774.2, con características de células presentadoras de antígenos, a través de

RT – PCR (figura 15). Se generan cambios muy leves en la expresión, suponiendo que bromocriptina podría tener un efecto directo, sin descartar el efecto indirecto cuando se cambian en forma más drástica los niveles de prolactina. El aumento en la expresión de estos receptores sobre las células presentadoras de antígenos activaría una serie de eventos intracelulares que culminan con la activación de NF- κ B y la transcripción de genes en el núcleo cumpliendo una función primordial en la inflamación, por lo tanto, estos receptores estarían expresados sin que exista presencia de virus. Esto nos permite observar el efecto directo que ejerce bromocriptina sobre estas células.

TLR	Ligando	Expresión celular
TLR 1	Modulina y lipopéptidos de bacterias gram (+)	Monocitos, neutrófilos, linfocitos B, células NK
TLR 2	Lipoproteínas, peptidoglicano y ácido teicoico de gram (+) Modulina de <i>Staphylococcus</i> Zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) LPS de <i>Leptospira interrogans</i> LPS de <i>P. Gingivalis</i> Lipoarabinomanano de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Proteínas GPI de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Monocitos, neutrófilos y células dendríticas
TLR 3	RNA viral	Células dendríticas
TLR 4	LPS de bacterias gram (-)	Monocitos, células endoteliales, neutrófilos y células dendríticas
TLR 5	Flagelina	Monocitos, células dendríticas
TLR 6	Lipoproteínas	Monocitos, células dendríticas
TLR 7	Compuestos antivirales	Leucocitos, células dendríticas
TLR 8	Compuestos antivirales	Leucocitos, células dendríticas
TLR 9	Secuencias CpG de DNA bacteriano	Monocitos, células dendríticas
TLR 10	Desconocido	Linfocitos B

Tabla 2. Funcionalidad de los TLRs.

8. CONCLUSIONES.

- La administración de Tg + CCF genera tiroiditis autoinmune experimental.
- La administración de diversas dosis de bromocriptina retarda el inicio de la respuesta inmune humoral en ratones experimentales.
- La administración de bromocriptina induce un menor daño e infiltración celular en los folículos tiroideos de los animales inmunizados con Tg + CCF.
- Bromocriptina aumenta la expresión de los receptores TLR-3 y TLR-4, tanto en las células foliculares tiroideas como en los cultivos celulares de macrófagos murinos J774.2.
- Bromocriptina altera el grado de activación del factor de transcripción NF-kB en las células foliculares tiroideas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Paul WE., Fundamental Immunology (1998). 4ª Edición. Ed Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
2. Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology (1994). 3^{era} Edición. Ed Masson- Saval Medicina, Londres, Inglaterra.
3. Pearl JP., Parris J., Hale DA., Hoffmann SC., Bernstein WB., McCoy KL., Swanson SJ., Mannon RB., Roederer M, Kirk AD. (2005) Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. Am. J. Transplant. 5:(465-74).
4. Jaramillo F., Gómez L., Anaya J., (2006) Regulatory T cells, infection and autoimmunity. Infectio. 3 :(178-185).
5. Weaver et al. (2006) Th17 cells in inflammatory conditions. Immunity 24: (677-688).
6. Bokoch G. (1995) "Chemoattractant signaling and leucocyte activation", *Blood* 86 5: (1649-1660).
7. Palomo I., Ferreira A., Sepúlveda C., Roseblatt M., Vergara U. Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica (2002). 1ª Edición. Ed. Universidad de Talca, Talca, Chile.

8. Flesch I., and Kaufmann, S. H. E. (1989) Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 138:(4408 – 4413).
9. Papavavacilio A. G. (1995) Transcription factors. N. Engl. J. Med. 332:(45-47).
10. Visintin A., Mazzoni A., Spitzer JH., Wyllie DH., Dower SK., Segal DM., (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J. Immunol. 166: (249-255).
11. Akira S., Kaisho T., (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2: (675-680).
12. Underhill DM., Ozinsky A., (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current Opinion of Immunol., 14:(103-110).
13. Akira S., Takeda K., (2004) Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 4: (499-511).
14. Jayalakshmi K., Kumar S., Masa T., Gwang L. and Sangdun C. (2007) Toll- like receptor signal transduction. Experimental and Molecular Medicine. 4: (421-438).
15. Abbas A., Cellular and Molecular Immunology (2000) 4ta Edición, Capítulo 10: (208-230); Capítulo 18: (416-423), WB Saunders.
16. Spiewak R. (2005) Atopy and contact hypersensitivity: a reassessment of the relationship using objective measures. Ann Allergy Asthma Immunol. 95: (61-65).
17. Beck-Peccoz P. et al. (1997) Thyrotropin-secreting pituitary tumors. Endocr. Rev. 17:610.

18. Junqueira L.C., J. (2005) Histología Básica. 5^a Ed. Masson, Barcelona. Cap 20: (389-395).
19. Brent GA. (1994) The molecular basis of thyroid hormone action. N. Engl. J. Med. 331: 847.
20. Morris G. P., And Kong Y.M. (2006) Tolerance to autoimmune thyroiditis: CD4+ CD25+ regulatory T cells influence susceptibility but do not supersede MHC class II restriction. Front. Biosci.11: (1234-1243).
21. Hutchings PR. et al. (1992) A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis. J. Exp. Med. 175:869.
22. Esquivel P., Rose N.R. and Kong Y. M. (1977) Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 145: (1250-1262).
23. Yi-chi M. Kong (2007) Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse. Curr. Protoc. Immunol. 78: (15.7.1-15.7.21).
24. Flynn J. C., Conaway D.H., Cobbold S., Waldmann H. (1989) Depletion of L3T4+ and Lyt-2+ cells by rat monoclonal antibodies alters the development of adoptively transferred experimental autoimmune thyroiditis. Cell. Immunol. 122:(377-90).
25. Sandoval C., Fonseca ME., Ochoa R. (1997) The transcendence of prolactin and its relation to the immune response. Ginecol. Obstet. Mex. 65:(148-51).
26. Goodman & Gilman. (2003) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (1567-1568).MéxicoD.F. : Editorial McGraw-Hill.

27. Bassetti M., Spada A., Pezzo G., Giannattasio G. (1984) Bromocriptine treatment reduces the cell size in human macroprolactinomas: a morphometric study. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 58: (268-73).
28. Cincota AH., Meier AH. (1996) Bromocriptine ergoset reduces body weight and improves glucose tolerance in obese subjects. *Diabetes Care* (667-670).
29. Paul L., Schiff J. (2006) Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ.* 70 (5): 98.
30. Bañados S. (2002) Factor de transcripción NF-kB en tiroiditis autoinmune experimental. Tesis, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.
31. Harii N., Lewis C., Vasko V., McCall K., Sun X., Ringel M., Saji M., Giuliani C., Napolitano G., Goetz D., Kohn L. (2005) Thyrocytes express a functional Toll-Like receptor 3: overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis. *Molecular Endocrinology* 19 (5): (1231-1250).
32. Guerin V., Todd I., Hammond L. J., Bottazzo G.F. (1990) Suppression of HLA class II expression on thyrocytes by interferon – alpha 1. *Clinic. Exp. Immunol.* 79: (341-345).
33. Guimaraes V., Quintans J., Fisfalen M. E., Straus F., Wilhem K., Medeiros-Neto G., DeGroot L. (1995) Suppression of development of experimental autoimmune thyroiditis by oral administration of thyroglobulin. *Endocrinology.* 136: (3353-3359).

34. Allen EM., Thupari JN. (1996) The pathogenicity of spontaneously occurring thyroglobulins reactive T lymphocytes from BB/Wor rats. *Autoimmunity* 23: (35-44).
35. De Assis Paiva HJ., Ragner DC., Roitt IM., Cooke A. (1989) Cellular infiltration in induced rat thyroiditis phenotypic analysis and relationship to genetic restriction. *Clin. Exp. Immunol.* 75:(106-12).
36. Gutiérrez MA., Molina JF., Jara LJ., García C., Gutiérrez- Urena S. (1996) Prolactin induced immunoglobulin and autoantibody production by peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and normal individuals. *Arch. Allergy Immunol.* 109: (229-35).
37. Sandoval C., Fonseca ME., Ochoa R. (1997) The transcendence of prolactin and its relation to the immune response. *Ginecol. Obstet. Mex.* 65: (148-51).
38. Siebenlist U., Brown K. (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor – kappa B . *Nat. Rev. Immunol.* 5 (6): (435-45).
39. Akira S., Kishimoto T. (1997) “NF- IL6 y NF- kappa B in cytokine gene regulation” *Adv. Immunol.* 65:(1-46).

10. ANEXO.

1. Buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,2):

Pesar 21,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 6,9 g de KH_2PO_4 anhidro y 36,1 g de NaCl, luego disolver en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2. Para obtener el PBS 1X, diluir 1:5 con agua destilada antes de ser utilizado y almacenar a 4 °C.

2. Medio RPMI- 1640 incompleto:

Disolver el medio RPMI en polvo en 900 mL de agua destilada estéril y fría, agregar a esto 2 g de NaHCO_3 y 2,4 g de HEPES. Agitar hasta su disolución. Ajustar el pH a 7,2, en caso que fuera necesario, agregar agua destilada hasta completar un volumen de 1 L. Esterilizar por filtración y almacenar a temperatura de 4 °C en oscuridad.

3. Medio RPMI- 1640 completo:

Para 100 mL, agregar 1 mL de piruvato de sodio 100x estéril, 1 mL de penicilina-estreptomicina 100x estéril, 1 mL de anfotericina B 100x estéril, 1 mL de 2 – mercaptoetanol 100x, 10 mL de suero bovino fetal (SBF) estéril y finalmente 86 mL de medio RPMI 1640 incompleto y estéril para completar los 100 mL, almacenar a 4 °C.

4. Buffer TBE 10x (pH 8,3):

Pesar 107 g de TRIS (0,089 M), 55 g de ácido bórico (0,089 M) y 3,7 g de EDTA (0,001 M), en 1 L de agua desionizada, ajustar a pH 8,3 y esterilizar en autoclave. Antes de ser utilizado diluir 1: 10 con agua desionizada, para obtener buffer TBE 1x. Almacenar a 4 °C.

5. Buffer carbonato – bicarbonato (pH 9,6):

Pesar 0,53 g de Na₂CO₃ (0,05 M), 0,42 g de NaHCO₃ (0,05 M) y diluir en 100 mL de agua destilada cada uno. Mezclar ambos reactivos hasta obtener pH 9,6. Mantener a temperatura ambiente.

6. Buffer fosfato – citrato (0,05 M)(pH 5,0):

Pesar 2,1 g de C₆H₈O₇ (0,1 M), 3,56 g de Na₂HPO₄ (0,1 M) y diluir en 100 mL de agua destilada cada uno. Mezclar ambos reactivos hasta obtener pH 5,0. Mantener a temperatura ambiente.

7. Buffer de bloqueo 5 %:

Pesar 5 g de leche descremada y diluir con 100 mL de PBS 1x. Mantener a 4 °C.

8. Buffer de lavado Tween 20 – PBS 1x 0,05 %:

Tween 20	0.25 mL
PBS 1x	500 mL

9. Buffer citrato de sodio (0,05 M):

Pesar 2,94 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (0,1 M), 2,10 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,1 M) y diluir en 100 mL de agua destilada cada uno. Mezclar ambos reactivos hasta obtener pH 6,0. Mantener a temperatura ambiente.

10. Sulfato de amonio saturado:

Pesar 900 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diluir hasta 1000 mL. Calentar hasta disolver completamente el sulfato de amonio, luego filtrar y guardara temperatura ambiente. Al momento de usar ajustar el pH a 7,4 con hidróxido de aluminio.

11. Suero fisiológico (0,15 M):

NaCl	9,0 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL.

12. Solución de Bromocriptina (0,844 mg/mL):

Mesilato de bromocriptina	12 mg
Etanol puro	1,776 mL
Aceite de maíz	12,444 mL

Se mezcla la bromocriptina con el etanol hasta obtener una mezcla transparente. Agregar gota a gota el aceite de maíz hasta obtener una mezcla homogénea. Almacenar a 4 °C.

