

INTRODUCCIÓN

La proteína cinasa de tipo I (PKA-I) participa en muchos procesos celulares, incluyendo la activación y proliferación de los linfocitos T. Se sabe que la Forskolina, un inductor de AMPc, influye sobre PKA e **inhibe la proliferación de los linfocitos T**. En el caso de los linfocitos B se desconoce el efecto de la actividad de PKA en la activación de éstas células, por lo que en este trabajo se presentan los resultados sobre el efecto de la Forskolina sobre la activación y proliferación de los linfocitos B.

OBJETIVO

Estandarizar un ensayo que nos permita observar si la Forskolina tiene un efecto sobre la activación y proliferación de los linfocitos B activados vía BCR.

METODOLOGÍA

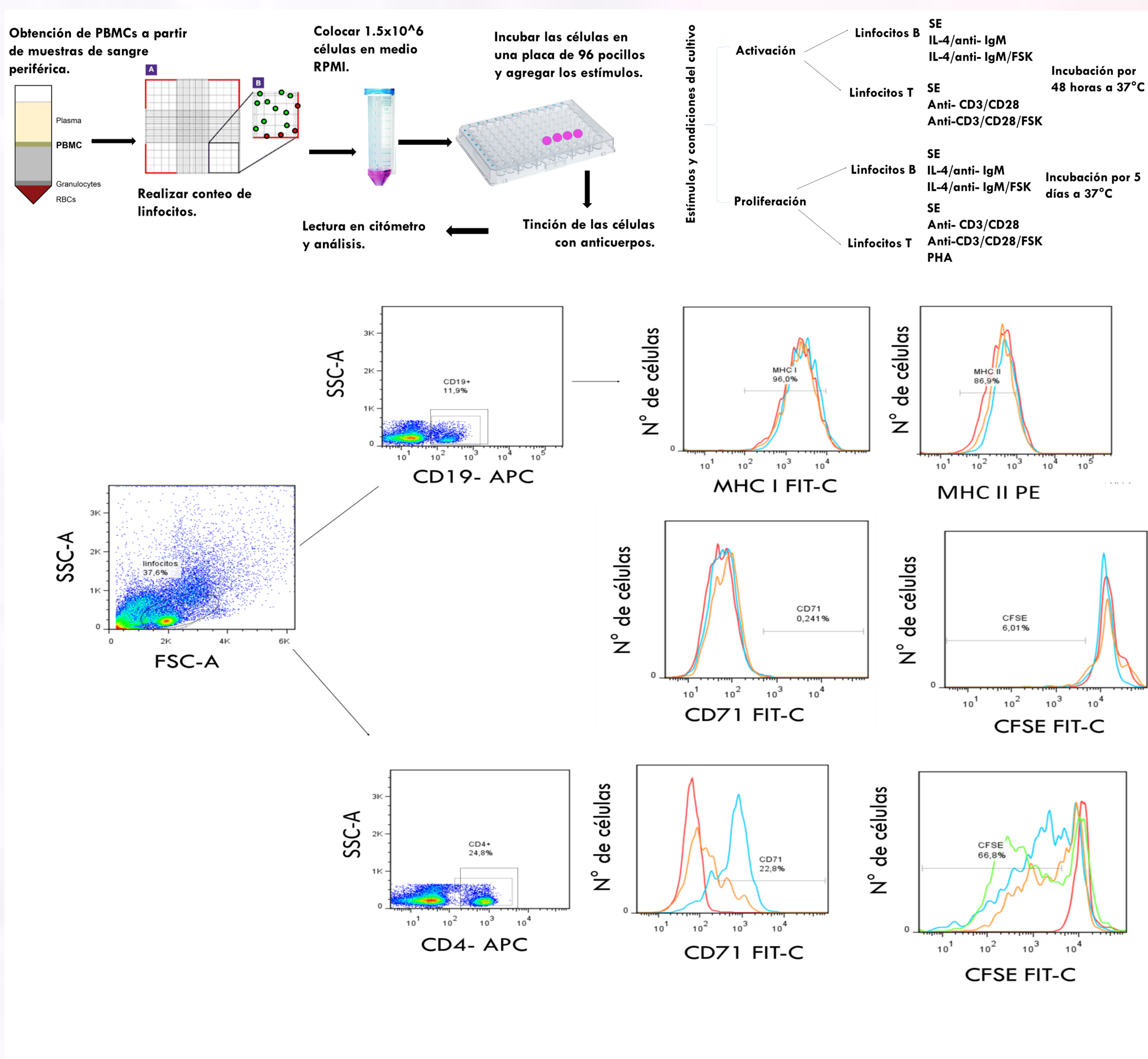


Fig. 1. Estrategia de análisis para determinación de los marcadores de activación y proliferación.

RESULTADOS

Para interpretar los resultados obtenidos, se decidió, obtener un factor que nos permitiera saber cuantas veces mas se expresa una molécula con respecto a un control. Para ello se utilizó el ejemplo a continuación.

$$SE(control) = \frac{2844}{2844} = 1 \quad IgM = \frac{3429}{2844} = 1.205 \quad FSK = \frac{2887}{2844} = 1.015$$

Muestra	IMF (Valores obtenidos de FlowJo)			Factor IMF (valores obtenidos con el cálculo)		
Control 1	SE	IgM/IL-4	IgM/IL-4/FSK	SE	IgM/IL-4	IgM/IL-4/FSK
	2844	3429	2887	1	1.205	1.015

El procedimiento anterior se aplicó para la expresión de MHC y la expresión de CD71. En el caso de la proliferación se utilizaron los valores de porcentaje de proliferación arrojados directamente de FlowJo.

A) La expresión de MHC tanto de clase I como de clase II parece tener un comportamiento a la baja al agregar la Forskolina como se puede apreciar en la figura 2. Al comparar los resultados de las muestras estimuladas con aquellas a las que se agregó la Forskolina no se observó una disminución significativa.

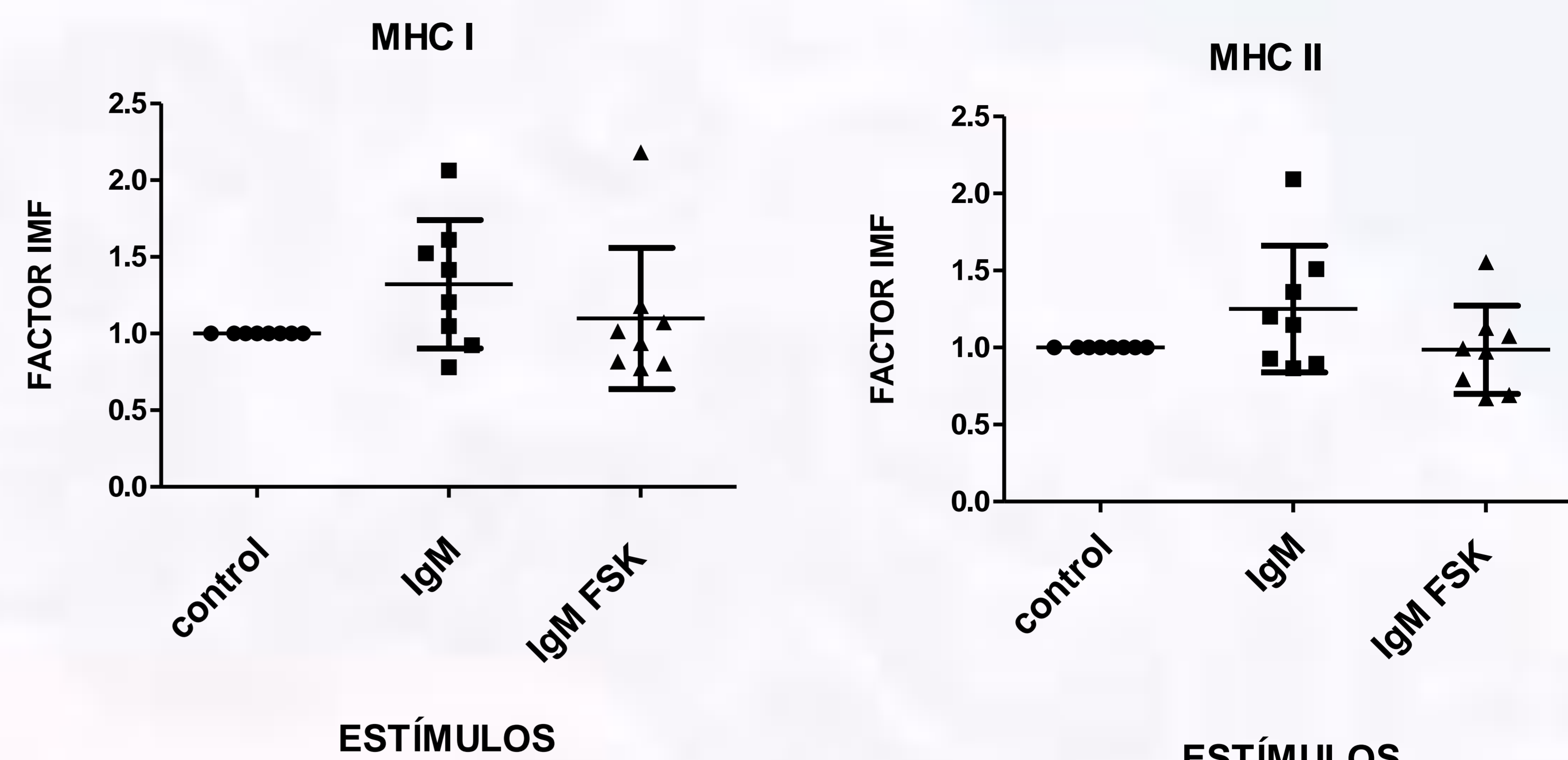


Fig. 2. Expresión de MHC clase I (izquierda) y clase II(derecha) bajo tres diferentes condiciones: Sin estímulo (SE), IgM/IL-4 e IgM/IL-4/Forskolina (FSK). Los resultados se expresan como el factor de la intensidad media de fluorescencia (IMF) MHC I. n=8, p= 0.234; MHC II, n=8,p=0.1949. Prueba U Mann Whitney, p<0.05.

B) La expresión de CD71 disminuye significativamente al agregar la Forskolina en los linfocitos T. Mientras que en el caso de los linfocitos B, no fue un buen marcador de activación. (Fig.3)

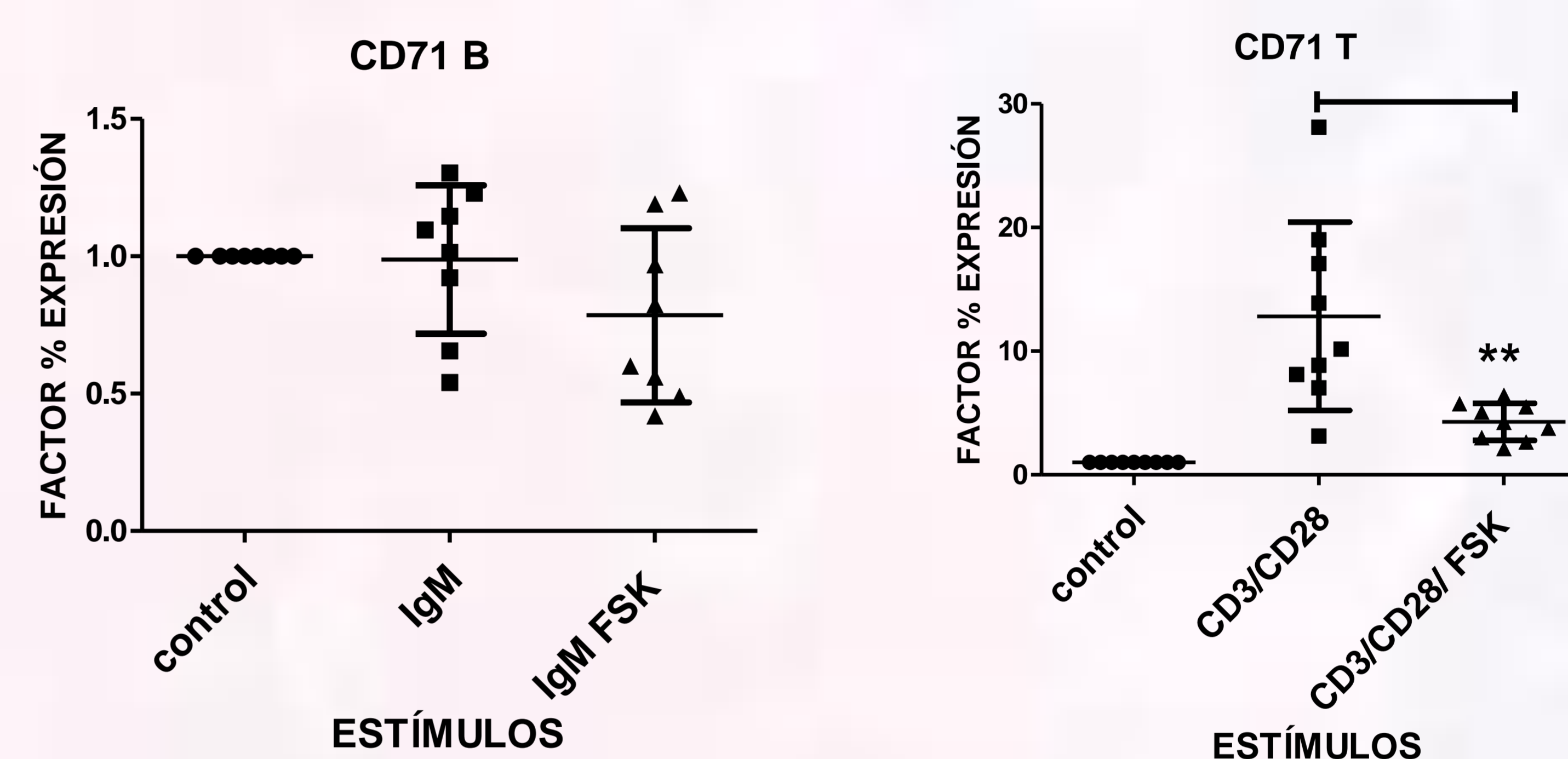


Fig.3. Resultados de la expresión de CD71 en linfocitos B (izquierda) y linfocitos T (derecha). Los datos se muestran como el factor de % de expresión de CD71 bajo tres diferentes condiciones. CD71 linfocitos B, n=8,p=0.2345. CD71 linfocitos T, n=9,p=0.0012. Prueba U Mann Whitney p<0.05.

C) La proliferación de linfocitos B Y T se ve ligeramente inhibida por la Forskolina, aunque en las condiciones de este ensayo no se encontraron diferencias significativas.

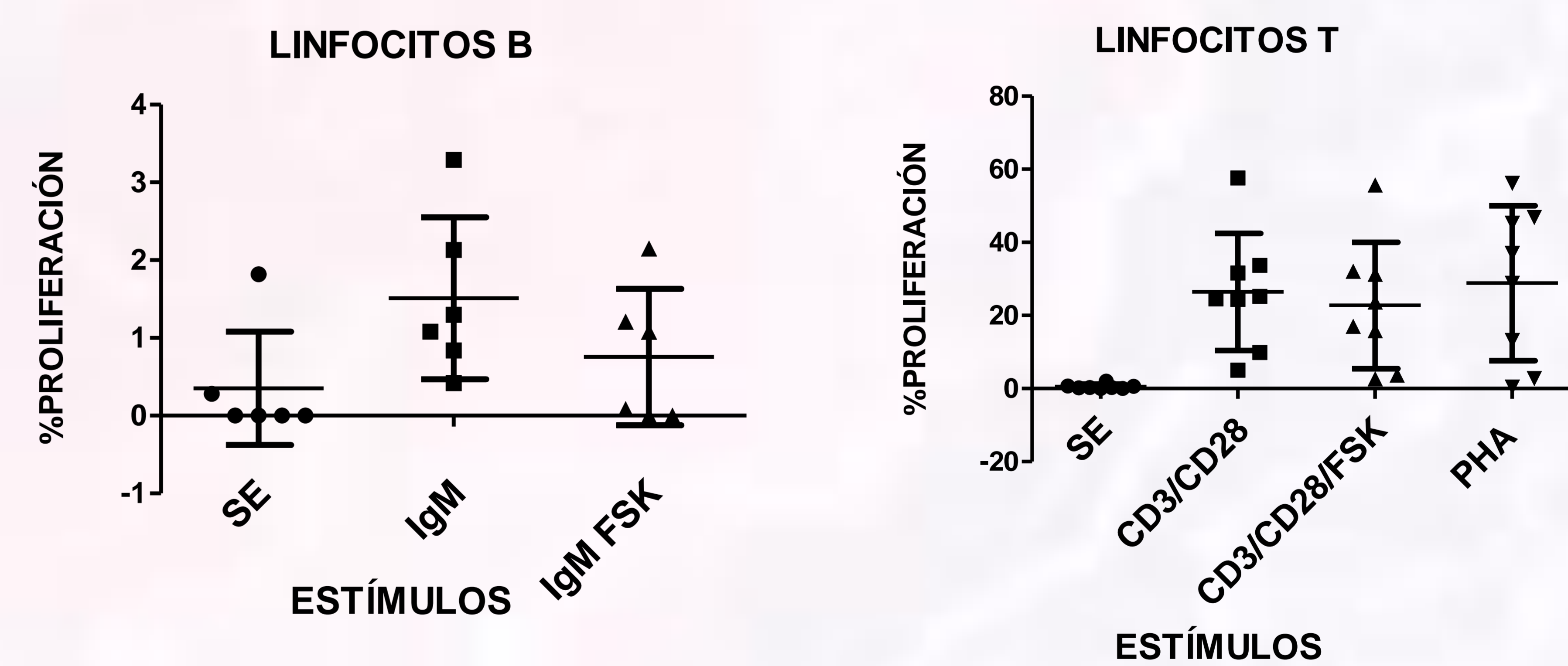


Fig4. Porcentaje de proliferación en linfocitos B (izquierda) y linfocitos T (derecha). Los datos se muestran como la dilución de la fluorescencia de CFSE. Linfocitos B, n=6,p=0.2615. CD71 linfocitos T, n=8, p=0.4418. Prueba U Mann Whitney p<0.05.

CONCLUSIONES

- La expresión de MHC (clase I y clase II) muestra una tendencia a la baja.
- La activación de los linfocitos T se ve afectada pues la disminución en la expresión de CD71 es significativa. Este marcador no funcionó para los linfocitos B.
- Se observa una ligera disminución en la proliferación de los linfocitos al agregar la Forskolina.
- Estandarizar estos ensayos nos permitirá extrapolarlos hacia muestras de pacientes con inmunodeficiencias y determinar la alteración que hay en la vía de activación de PKA.

BIBLIOGRAFÍA

Knut Martin Torgersen, et.al. (2002).Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function, Cellular Signalling, Pages 1-9, [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00214-5).