

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Expresión del Receptor de Prolactina en linfocitos
activados, inhibidos y autoinmunes”

Lic. María Tamara Moreno Sosa

Director: Dr. Juan Pablo Mackern Oberti

Directora Asociada: Dra. Virginia Elena Rivero



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2021

COMISIÓN ASESORA

Silvia Correa – Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC. Córdoba, Argentina

Nicolás Nazar – Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT) CONICET-UNC. Cátedra de Morfología Animal de la FCEFyN, UNC, Argentina.

Juan Pablo Mackern Oberti – Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET-UNCuyo. Mendoza, Argentina.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

A mis padres, hermanos y esposo
que siempre me alientan a continuar

Agradecimientos

A JP, por confiar en mí siempre y escucharme, por brindarme su conocimiento, dedicación, enseñanza, motivación y apoyo incondicional.

A Grace, por brindarme su conocimiento y experiencia, tanto profesional como personal.

A Vicky, por sus palabras de aliento, predisposición a ayudarme y compartir el conocimiento.

A Alexis Kalergis, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme crecer personal y profesionalmente.

A mis amigas y colegas Belén, Flavia, Marta, Elisa y Susana por estar en todas, compartir charlas, mates, responder mis dudas y alentarme siempre a seguir.

A Estefi, Pau y Juanma, por los mates, las charlas, el trabajo y las risas compartidas.

A Patri y Juan por tratarme con tanto cariño y estar predispuestos a ayudarme siempre.

A todos los integrantes del Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU) - CCT - Mendoza, CONICET, por hacerme sentir como en casa brindándome el lugar y los elementos necesarios para trabajar.

A Ire, Omi y María José, por las risas y charlas, por acompañarme y ayudarme siempre.

A los integrantes del laboratorio de AK y SB, por su predisposición a ayudarme en todo momento.

A la Universidad Nacional de Córdoba, por abrirme las puertas, instruirme y darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los miembros del comité evaluador y del jurado por acompañarme a lo largo de mi doctorado, y por su aporte crítico en la revisión de mi tesis doctoral.

A Elena y Carlos, mis papás, por darme la vida, amarme, confiar en mí y brindarme su apoyo incondicional. Por mostrarme el camino, y por permitirme siempre elegirlo.

A Gabriel y Laureano, mis hermanos, por ser mi fuerza, mi cable a tierra y mis compañeros incondicionales.

A Matías, mi hermoso ángel, por enseñarme tanto, por ponerme siempre los pies en la tierra y por ser el gran maestro de mi vida.

A Mauricio, mi esposo, amigo y compañero, por ser y estar, por acompañarme en mis sueños y confiar en mí, por amarme y enseñarme tanto.

A Santino, por su aceptación, amor, compañía y comprensión.

A mi abuela María, por sus besos, abrazos y su amor incondicional.

A Marcela, mi madrina, tía, amiga y confidente, por prestarme su oído y regalarme sus abrazos, por confiar en mí y por estar siempre presente.

A mi tía Gachi, por su amor incondicional, paciencia, confianza, apoyo y conocimiento.

A mi familia cordobesa, por recibirme con las puertas abiertas, por regalarme su paciencia, brindarme aliento y gran amor.

A mis sobrinos, primos y tíos, por todo el amor, apoyo y confianza que siempre me brindan.

A mis amigos, por las charlas y risas, por estar siempre presentes y ser mi segunda familia.

Índice

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
SISTEMA INMUNE.....	10
ENFERMEDADES AUTOINMUNES	11
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	12
MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	16
RELACIÓN ENTRE PROLACTINA Y LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES	16
RECEPTOR DE PROLACTINA	18
EVOLUCIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
PACIENTES CON LES	24
MUESTRAS DE SANGRE HUMANA.....	24
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	25
MEDICIÓN DE PARÁMETROS ASOCIADOS CON LES	26
<i>Proteinuria</i>	<i>26</i>
<i>Índice esplénico.....</i>	<i>26</i>
<i>Anticuerpos anti ADN</i>	<i>26</i>
CULTIVO IN VITRO DE ESLENOCITOS	27
DETERMINACIÓN DE ARN MENSAJERO MEDIANTE QPCR	28
VALIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE QPCR DE LAS ISOFORMAS DE PRL-R	29
DETERMINACIÓN DE ARNm DE PRL-RL Y PRL-RS EN POBLACIONES CELULARES PURIFICADAS POR CELL SORTING	30
DETERMINACIÓN DE PRL-R MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DESARROLLADO EN R	31
<i>Análisis de clusters y Heatmap.....</i>	<i>34</i>
<i>Análisis de Expresión Diferencial</i>	<i>34</i>
<i>Análisis de Correlación</i>	<i>34</i>
RESULTADOS.....	36
OBJETIVO 1: EXPRESIÓN DE ARNm DE PRL-R EN CÉLULAS INMUNES MURINAS	36
<i>Expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-RS en esplenocitos y poblaciones linfocitarias murinas</i>	<i>36</i>
OBJETIVO 2: EXPRESIÓN DE ARNm/PROTEÍNA DE PRL-R EN ESLENOCITOS MURINOS LUEGO DE LA ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN	39
<i>Estimulación de esplenocitos murinos con ConA y Dexa</i>	<i>39</i>
<i>Expresión de ARNm de PRL-R en esplenocitos de ratones C57 en respuesta a la activación con ConA e inhibición con Dexa</i>	<i>40</i>
<i>Expresión proteica de PRL-R en esplenocitos de ratones C57 en respuesta a la activación con Con A e inhibición con Dexa</i>	<i>41</i>

<i>Expresión de PRL-R en LT reguladores en respuesta a la activación con ConA e inhibición con Dexametasona</i>	<i>42</i>
OBJETIVO 3: EXPRESIÓN DE ARNm/PROTEÍNA DE PRL-R EN ESLENOCITOS DE RATONES CON LES	45
<i>Análisis de parámetros clínicos e inmunológicos de Animales propensos a LES.....</i>	<i>45</i>
<i>Expresión ex vivo de PRL-R en esplenocitos de ratones lúpicos</i>	<i>46</i>
<i>Modulación de los niveles de ARNm de PRL-RL en respuesta a la activación e inhibición linfocitaria ...</i>	<i>47</i>
<i>Modulación de la expresión de PRL-R en LB CD19⁺ en estado basal y en respuesta a la activación e inhibición.....</i>	<i>48</i>
<i>Expresión de PRL-R en timocitos de ratones C57 y FAS.....</i>	<i>49</i>
OBJETIVO 4: EXPRESIÓN GÉNICA Y DE ARNm DEL PRL-R EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LES	51
<i>Expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas.....</i>	<i>51</i>
<i>Validación de los productos de qPCR de las isoformas de PRL-R</i>	<i>51</i>
<i>Comparación de la expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas de individuos sanos y pacientes con LES.....</i>	<i>53</i>
<i>Correlaciones entre la expresión de las isoformas de PRL-R y parámetros clínicos como el SLEDAI y la duración de la enfermedad.....</i>	<i>55</i>
<i>Análisis de expresión génica de individuos sanos y pacientes con LES</i>	<i>56</i>
<i>Análisis de expresión génica de pacientes con LES</i>	<i>58</i>
<i>Expresión de PRL y PRL-R en LES I y LES II en relación al grupo control</i>	<i>60</i>
<i>Diferencias de expresión génica entre los grupos de pacientes LES I y LES II.....</i>	<i>61</i>
<i>Análisis de correlación entre los niveles de expresión de PRL, PRL-R y genes que forman parte de las vías moleculares de STAT5 y STAT3</i>	<i>62</i>
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	76
PERSPECTIVAS FUTURAS	77
ANEXO	89

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ac	Anticuerpo
APC	Célula presentadora de antígenos
CD	Células dendríticas
ConA	Concanavalina A
Dexa	Dexametasona
FAS	Ratones de la cepa MRL/MpJ-Fas ^{lpr}
FBS	Suero Fetal Bovino
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
hiperPRL	Hiperprolactinemia
LB	Linfocito B
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LT	Linfocito T
LThF	Linfocito T <i>helper</i> Folicular
LTreg	Linfocito T regulador
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
NZM	Ratones de la cepa B6;NZM- <i>Sle1</i> ^{NZM2410/Aeg} <i>Sle2</i> ^{NZM2410/Aeg} <i>Sle3</i> ^{NZM2410/Aeg} /LmoJ
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Bufer Fosfato Salino
PRL	Prolactina
PRL-R	Receptor de Prolactina
PRL-RL	Receptor de Prolactina largo
PRL-RS	Receptor de Prolactina corto murino
PRL-R1b	Receptor de Prolactina corto humano
qPCR	PCR en Tiempo Real
R11b	Ratones de la cepa FcγR11b KO
SLEDAI	Índice de Actividad de Lupus Eritematoso Sistémico
SS	Solución Salina
TCR	Receptor de Linfocitos T
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	Tetrametilbencidina

Resumen

Prolactina (PRL) es una hormona peptídica que realiza múltiples funciones incluyendo la modulación de células inmunes. Diferentes patologías autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES), presentan una asociación con un estado de hiperprolactinemia. Las acciones de PRL están mediadas principalmente por la isoforma larga de su receptor (PRL-RL). La presencia y función del PRL-R en las diferentes poblaciones linfocitarias son controversiales, por lo que es interesante dilucidar su rol en el sistema inmune. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y modulación con Concanavalina A (ConA) y Dexametasona (Dexa) del PRL-R en linfocitos de ratones sanos y propensos a desarrollar LES. Además, analizamos si lo observado sobre PRL-R a nivel murino también se observa en individuos sanos y pacientes con LES. Se utilizaron esplenocitos de ratones hembras de la cepa C57BL/6 (C57) como cepa control, y tres cepas que desarrollan espontáneamente LES: i) B6;129S-*Fcgr2b*^{tm1Ttk}/J (RIIb), ii) B6;NZM-*Sle1*^{NZM2410/Aeg} *Sle2*^{NZM2410/Aeg} *Sle3*^{NZM2410/Aeg}/LmoJ (NZM) y iii) MRL/MpJ-Fas^{lpr} (FAS). Los mismos se estudiaron ex vivo y luego de la estimulación con 1µg/ml de ConA o Dexa durante 24 horas. Para el estudio de PRL-R se evaluó ARNm y proteína mediante RT-PCR y citometría de flujo. En muestras humanas el estudio incluyó análisis de expresión génica y correlación realizados sobre un set de datos de muestras de individuos sanos y pacientes con LES provenientes de la base GEO. Los esplenocitos de ratón expresan el ARNm de las isoformas larga (PRL-RL) y corta (PRL-RS) del PRL-R. Sin embargo, los niveles de PRL-RS encontrados fueron muy bajos impidiendo ser cuantificados por PCR en tiempo real (qPCR). Se encontró que diferentes poblaciones linfocitarias expresan PRL-R aunque la frecuencia es dependiente del tipo celular células CD19⁺ presentan un mayor porcentaje de PRL-R (15%) en comparación con células CD4⁺ (1%) o CD8⁺ (0,5%). La expresión de PRL-R en células CD4⁺ de ratones C57 no mostró cambios luego de la estimulación con ConA y Dexa. Sin embargo, células CD19⁺ presentaron una disminución del receptor cuando se estimuló con ConA y un aumento cuando el estímulo fue Dexa. El aumento en el porcentaje de células luego de la estimulación con Dexa también se observó en células CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺. La expresión del PRL-R en esplenocitos de ratones RIIb y FAS tuvieron mayor expresión de ARNm de PRL-RL que las otras cepas ex vivo. Sin embargo, in vitro, todas las cepas presentaron niveles basales similares de PRL-R y solo existieron diferencias luego de la estimulación con ConA y Dexa. Al analizar muestras de sangre periférica humana, se encontró un leve aumento de la relación PRL-RL/PRL-R1b (isoforma corta

humana) en pacientes con LES en relación a los individuos control. Resultados similares se evidenciaron al evaluar la expresión de PRL-R en un set de datos de expresión génica de individuos sanos y pacientes con LES. Adicionalmente, encontramos que pacientes lúpicos presentan una correlación entre PRL y moléculas de supervivencia celular. Los datos obtenidos evidencian que células inmunes expresan ambas isoformas del PRL-R, siendo PRL-RL la predominante. Asimismo, los LB tienen una mayor expresión del receptor que las poblaciones de LT. Esto sugiere que las células inmunes son sensibles a PRL y que la respuesta a PRL es regulada en función de la activación y supresión celular, y de la población linfocitaria analizada. Nuestros resultados indican que durante una patología lúpica la expresión de PRL-R en las poblaciones linfocitarias se ve alterada sugiriendo que PRL podría tener una respuesta diferencial en la funcionalidad celular. Como hemos visto que la correlación entre PRL y proteínas antiapoptóticas también aumenta en LES, la interacción PRL/PRL-R podría estar promoviendo una mayor supervivencia celular y regulación inmune en pacientes con LES, contribuyendo así a la perpetuación de la enfermedad.

Introducción

Sistema inmune

Las células y las moléculas responsables de brindar protección frente a patógenos y otorgar inmunidad constituyen el sistema inmune (Boraschi et al., 2017). Las sustancias ajenas que inducen respuestas inmunitarias se denominan antígenos (Ryden et al., 2014). La forma en la que se procesan los estímulos antigénicos depende de la herencia genética propia del organismo, de la naturaleza del antígeno, de las exposiciones previas al mismo y de las condiciones de su presentación, entre otros factores (Harbige et al., 2017). Moléculas relacionadas con el sistema endócrino, como las hormonas, también tienen gran influencia en el éxito de una respuesta inmune competente y saludable (Dimitrov et al., 2004; Isidori et al., 2018; Jeay et al., 2002).

Dentro de las propiedades de las respuestas inmunes, la tolerancia inmunitaria se define como una falta de respuesta específica a un antígeno inducida por una exposición previa al mismo (Harbige et al., 2017). Cuando un linfocito se encuentra con su antígeno específico puede activarse, lo que conduce a una respuesta inmunitaria. Sin embargo, si el encuentro con el antígeno se produce en condiciones tolerogénicas, el linfocito puede inactivarse, sufrir anergia o eliminarse (Abul K. Abbas, 2012). Cuando un antígeno induce tolerancia se lo denomina tolerógeno o antígeno tolerogénico. Un mismo antígeno puede ser un inmunógeno o un tolerógeno, dependiendo de las condiciones en las que se lo presente a los linfocitos específicos (Abul K. Abbas, 2012).

En el caso de que un linfocito presente alteraciones intrínsecas que lo lleven a activarse de forma exacerbada, tener una mayor capacidad de sobrevivir o ser más resistente a la apoptosis, los mecanismos de regulación inmune podrían verse alterados. En estos casos, los mecanismos del sistema inmune son capaces de provocar lesiones tisulares y enfermedad a través de moléculas propias que desencadenan respuestas inmunes perjudiciales para el propio organismo llevando al desarrollo de autoinmunidad (Guffroy et al., 2017).

Enfermedades Autoinmunes

La autoinmunidad es un fenómeno universal que surge como consecuencia de la falla en los mecanismos de tolerancia inmune de los vertebrados (Murata et al., 2018). Se conoce como autoinmunidad a la falta de discriminación entre lo propio y lo ajeno por parte del sistema inmune, es decir, el fracaso de la tolerancia inmunológica. Esto deriva en una respuesta inmune específica contra antígenos propios, en donde juegan un rol muy importante la presencia de autoanticuerpos y de linfocitos T (LT) autoreactivos (Abbas et al., 2004; Chihara et al., 2018).

La presencia de autoanticuerpos y/o LT autoreactivos dirigidos a antígenos propios con una distribución tisular específica desencadena las enfermedades autoinmunes específicas de órgano, como la Diabetes Tipo 1, la Tiroiditis de Hashimoto y la Esclerosis Múltiple (Herold et al., 2019; Li et al., 2019; Schafflick et al., 2020); mientras que la presencia de autoanticuerpos y/o LT autoreactivos que reconocen antígenos propios de amplia distribución desencadenan enfermedades autoinmunes sistémicas como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y la Artritis Reumatoide (Chodisetti et al., 2020; Degn et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Durante las últimas décadas se han reportado avances en relación a los mecanismos patogénicos de las enfermedades autoinmunes (Gratz et al., 2014; Oftedal et al., 2015). Los defectos en la selección negativa de LT y/o linfocitos B (LB), la apoptosis o anergia defectuosa de los linfocitos, la falta o falla de función en el proceso de maduración linfocitaria, la selección clonal y supresión de la respuesta inmune, son algunos de los mecanismos de pérdida de tolerancia que se asocian a la etiología de las enfermedades autoinmunes (Theofilopoulos et al., 2017). Se postula que múltiples factores intervienen en el desencadenamiento de estas patologías, y estos incluyen componentes genéticos, ambientales, farmacológicos, infecciosos y hormonales que confieren una mayor susceptibilidad o mayor riesgo, pero no aseguran su desarrollo (Ganesh et al., 2011; Martin et al., 2015; Tomer and Huber, 2009). La alta incidencia de enfermedades autoinmunes sobre el sexo femenino respecto del masculino sugiere que moléculas ligadas al género femenino son un factor de riesgo muy importante (Ostensen et al., 2015).

Debido a la heterogeneidad de las enfermedades autoinmunes su prognosis suele ser muy variable (Li et al., 2013). Si bien hay tratamientos para las mismas, aún no se han desarrollado terapias específicas y eficaces para los trastornos autoinmunes sistémicos (Hahn, 2013; Suurmond et al., 2015). La mayoría de las terapias actuales se fundamentan

en la administración de drogas inmunosupresoras conduciendo a una supresión generalizada del sistema inmune con severas complicaciones asociadas (Houssiau and Ginzler, 2008). Los estudios que logren identificar mecanismos patogénicos primordiales en el desarrollo de la autoinmunidad sistémica permitirán diseñar terapias efectivas que reduzcan sólo la respuesta autoinmune y resguarden la competencia del sistema inmune.

Lupus Eritematoso Sistémico

El LES es una enfermedad autoinmune sistémica prototípica y altamente heterogénea (Fava and Petri, 2019). Dicha heterogeneidad produce inmensos desafíos para el diagnóstico, el tratamiento y los avances terapéuticos.

El lupus eritematoso fue descrito por Hargraves y colaboradores en 1948 (Hargraves et al., 1948). Desde entonces hubo grandes avances en el conocimiento de la enfermedad y su patogenia, y hoy se sabe que factores genéticos, hormonales y ambientales, entre otros, intervienen en el desencadenamiento del LES.

Se han identificado más de 80 genes o loci fuertemente asociados con LES, algunos de los cuales codifican proteínas implicadas en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, y la generación de autoantígenos (Armstrong et al., 2014; Deng and Tsao, 2014; Gateva et al., 2009; Han et al., 2009; Namjou et al., 2011). Se han reportado mutaciones genéticas en componentes tempranos del complemento C1q, C1r, C1s (> 90% de riesgo), C4 (50%), C2 (20%); la exonucleasa TREX1; genes HLA-DRB1, HLA-DR2/DR3, HLA-DRX; factores de transcripción TNFAIP3, STAT-4, STAT-1 y otros receptores y proteínas de señalización como TLR7, IRAK1/MECP2, IRF5-TNPO3 e ITGAM (Deng and Tsao, 2014). Si bien no se conoce con certeza la implicancia de la herencia en el desencadenamiento de LES, se ha observado en gemelos idénticos que parte de la predisposición genética total al LES puede atribuirse a genes fuera de la región HLA (Antígeno Leucocitario Humano) (Grennan et al., 1997).

La ruptura de la homeostasis hormonal es un factor de riesgo significativo para el LES. Numerosos estudios indican que estrógeno y prolactina (PRL) intervienen en el desarrollo de la enfermedad generando un aumento de los títulos de anticuerpos anti-ADN y promoviendo la supervivencia y activación de LB autorreactivos de alta afinidad (Grimaldi et al., 2006; Peeva et al., 2003). Además, la pérdida de la homeostasis hormonal afecta la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- α e IL-6, y altera la expresión de moléculas CD40, CD86 y del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHC II) en células dendríticas (CD) convencionales y plasmocitoides (Mackern-Oberti et al., 2017). Un porcentaje de pacientes

con LES cursan con hiperprolactinemia y solo algunos estudios muestran una correlación positiva entre el aumento de PRL y la severidad de la enfermedad (Karimifar et al., 2013; Orbach et al., 2007). El uso de anticonceptivos estrogénicos y la terapia de reemplazo hormonal pueden causar brotes leves y moderados en pacientes menopáusicas con LES (Buyon et al., 2005) y predisponen a una mayor incidencia de LES (Sanchez-Guerrero et al., 1997).

Muchos mediadores celulares y genéticos de la respuesta inmune innata y adaptativa se encuentran implicados en la patología de LES (Bashant et al., 2021; Katsuyama et al., 2018; Tilstra et al., 2020; Yin et al., 2015). La liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) representa una función efectora de neutrófilos asociada al LES y otras enfermedades autoinmunes. Otros mediadores involucrados en la enfermedad lúpica son los receptores tipo toll (TLR) endosomales TLR-7 y TLR-8 que reconocen y responden a ARN de cadena simple, y el TLR-9 que reconoce ADN de doble cadena (Celhar et al., 2012; Richez et al., 2011). La sobreexpresión de TLR-7 es un impulsor de la patogénesis del LES (Fairhurst et al., 2008) mientras que su delección en modelos murinos propensos a LES resulta en una enfermedad más leve (Christensen et al., 2006). En CD, la deficiencia de Blimp1 altera la regulación de catepsina S, contribuyendo al fenotipo lúpico al modular de manera diferencial la presentación antigénica y el repertorio de LT *helper* foliculares (LThF). Los LThF son una subpoblación particular de LT que participa en la cooperación LT-LB (Kim et al., 2017) y aumentan en pacientes con LES (Kim et al., 2018; Kim et al., 2017). La activación y señalización de distintas subclases de LT, también juega un rol importante en la patología de LES (Katsuyama et al., 2018). Se ha encontrado una mayor cantidad de LT *helper* 17 y mayores niveles de IL-17 en pacientes y ratones con LES en comparación a individuos sanos, y este aumento de IL-17 se correlaciona con una mayor actividad de la enfermedad (Konya et al., 2015; Yang et al., 2013). Además, los LT CD4⁺ autorreactivos de ratones propensos a LES tienen aumentadas vías metabólicas importantes como la glucólisis y el metabolismo oxidativo mitocondrial (Yin et al., 2015), indicando que la patología lúpica se ve promovida por las acciones que involucran LT activados, proliferativos y efectores. Sin embargo, se ha observado que una vez infiltrados en el riñón, LT CD4⁺ y CD8⁺ se vuelven altamente disfuncionales, expresando múltiples receptores inhibidores, reduciendo la producción de citoquinas y su capacidad proliferativa (Tilstra et al., 2018).

En modelos murinos propensos a LES se han demostrado fallas en múltiples puntos de control celular durante la maduración y activación de LB que serían claves para evitar la autorreactividad (Grimaldi et al., 2002; Grimaldi et al., 2001; Jacobi et al., 2009; Santulli-

Marotto et al., 2001). La ruptura de tolerancia de LB dada por estas fallas contribuye de manera importante a la patología de LES (Wardemann et al., 2003; Woods et al., 2015). Se han identificado numerosos autoanticuerpos patogénicos en LES (Faliti et al., 2019; Tan, 1991), los cuales son utilizados en el diagnóstico (Aringer et al., 2019) y sirven para determinar el índice de actividad de la enfermedad, ya que el título de anticuerpos se correlaciona positivamente con la actividad de LES (Vlahakos et al., 1992). Como se puede ver, múltiples vías inmunopatogénicas que involucran tanto receptores de la inmunidad innata, como LB y diferentes subpoblaciones de LT, tienen un papel significativo en el desarrollo de LES y es importante seguir indagando en las mismas para esclarecer la etiología de la enfermedad y diseñar tratamientos y terapias más efectivas.

El LES afecta más a mujeres que a hombres, con una proporción de 9 a 1 y es predominante en mujeres de edad fértil de entre 16,2 y 42,2 años de edad, y aunque el riesgo disminuye después de la menopausia, la predominancia sigue siendo mayor en mujeres en relación a hombres (Al Dhanhani et al., 2017; Gonzalez Lucero et al., 2020).

También se ha informado que diferencias étnicas se asocian con distintas tasas de prevalencia e incidencia de LES. Los registros de LES de Georgia y Michigan indicaron una prevalencia de 72,1 a 74,4 casos/100.000 personas/año y tasas de incidencia de 5,6 casos/100.000 personas/año en poblaciones principalmente caucásicas y afroamericanas (Lim et al., 2014; Somers et al., 2014). En los Emiratos Árabes Unidos la incidencia fue de 8,6 casos/100.000 personas/año y la prevalencia de 103 casos/100.000 personas/año (Al Dhanhani et al., 2017). En Buenos Aires, Argentina, entre los años 1998 y 2009 la prevalencia de la enfermedad fue de 46,1 a 73,5 casos/100.000 personas/año y la tasa de incidencia de 6,3 casos/100.000 personas/año (Scolnik et al., 2014). Estudios más recientes en Tucumán, Argentina, muestran una prevalencia de 34,9 casos/100.000 personas/año y un aumento de la incidencia con el progreso de los años, ya que en 2005 era de 1,8 casos/100.000 personas y en 2012 de 4,2 casos/100.000 habitantes (Gonzalez Lucero et al., 2020).

Debido a su gran heterogeneidad, la presentación clínica de LES es muy variable e involucra desde manifestaciones mucocutáneas leves hasta afectación multiorgánica y grave, incluyendo afecciones en el sistema nervioso central (Pamuk et al., 2013; Sebastiani et al., 2016). Puede cursar con serositis, síndrome nefrótico, nefritis, linfadenopatía, incidencia de erupción malar, fotosensibilidad, púrpura/vasculitis cutánea, alopecia/caída del cabello, fenómeno de Raynaud y manifestaciones neuropsiquiátricas (Boddaert et al., 2004). La patología de las lesiones cutáneas involucran la formación de inmunocomplejos que

provocan daño tisular, inflamación vascular y perivascular e infiltración crónica de células mononucleares, hiperqueratosis y taponamiento folicular (Justiz Vaillant et al., 2020). La nefritis lúpica afecta hasta al 60% de los pacientes con LES comprometiendo los glomérulos, el intersticio, los túbulos y los vasos debido también al depósito de inmunocomplejos (Bertsias et al., 2012; Hahn et al., 2012). La linfadenopatía es común en estos pacientes y la patología puede revelar hiperplasia folicular con células gigantes, infiltración de células plasmáticas en las zonas interfoliculares y necrosis de las zonas paracorticales de LT. La esplenomegalia también es común en el LES y son frecuentes la hiperplasia folicular y la fibrosis periarterial (Justiz Vaillant et al., 2020).

El diagnóstico de LES es un desafío debido a su amplia y aún no esclarecida patogenia, su variada presentación clínica y la limitada sensibilidad/especificidad de algunos métodos convencionales de evaluación como el análisis de anticuerpos anti-ADN de doble cadena, marcadores de fase aguda y la medición de la proteína C reactiva (Nagafuchi et al., 2019). Aunque se han planteado varios criterios de clasificación, su utilidad en el entorno clínico sigue siendo un tema de debate (Aringer et al., 2019; Nagafuchi et al., 2019; Vasquez-Canizares et al., 2017).

Existe una amplia gama de tratamientos para el LES pero todos implican la inmunosupresión de por vida de los pacientes. Los glucocorticoides como prednisona y dexametasona (Dexa), han sido durante años la base del tratamiento del LES y de la mayoría de las enfermedades autoinmunes sistémicas. Estos son el acompañante habitual de los fármacos inmunodepresores como la ciclofosfamida, micofenolato y azatioprina, que se utilizan también en pacientes con LES agudo. También se utilizan para el tratamiento antipalúdicos o Belimumab (anticuerpo monoclonal que bloquea el factor Blys, estimulador de LB), pero este incluye graves efectos secundarios y es posible que no prevenga el daño orgánico (Chambers et al., 2009; Oglesby et al., 2013; Tanaka, 2020).

El LES no tratado o tratado de forma inadecuada puede provocar complicaciones graves e incluso la muerte de los pacientes, y a pesar de que algunos fármacos demostraron ser eficaces, la enfermedad aún presenta un riesgo significativo de morbilidad y mortalidad (Chambers et al., 2009; Yurkovich et al., 2014). Es por ello de vital importancia esclarecer la etiología de LES para así poder diseñar terapias y tratamientos más eficaces para la enfermedad.

Modelos experimentales utilizados para el estudio de Lupus Eritematoso Sistémico

Se han descrito diferentes cepas de ratones que son de utilidad para el estudio de LES, dentro de las cuales se incluyen los ratones B6;129S-*Fcgr2b*^{tm1Ttk}/J (RIIb), B6;NZM-Sle1^{NZM2410/Aeg} Sle2^{NZM2410/Aeg} Sle3^{NZM2410/Aeg}/LmoJ (NZM) y MRL/MpJ-Fas^{lpr} (FAS) (Gordon et al., 2020; Stohl et al., 2020; Surawut et al., 2018). Los ratones RIIb son homocigotos para la mutación dirigida *Fcgr2b*^{tm1Ttk} que lleva a la ausencia del receptor *FcγRIIb* inhibitorio expresado en LB, monocitos y DCs. Al carecer de este receptor inhibitorio, los LB no pueden autorregular la producción de anticuerpos lo que induce un aumento de los niveles de inmunoglobulina que resultan en una pérdida de la tolerancia periférica (<https://www.jax.org/strain/002848>). La cepa de ratones NZM se caracteriza por ser homocigota para tres locus de rasgo cuantitativo de susceptibilidad al lupus (Sle1, Sle2, Sle3) con compromiso de LT y LB. Esto los lleva a desarrollar una autoinmunidad sistémica con edema generalizado, insuficiencia renal, elevada proteinuria y una glomerulonefritis letal (<https://www.jax.org/strain/007228>). Los ratones FAS tienen una mutación espontánea del gen Fas (Fas^{lpr}) que induce linfoproliferación de LT con la consecuente pérdida de tolerancia central, generando así una autoinmunidad sistémica prototípica de LES con artritis, lesiones cutáneas y glomerulonefritis inducida por complejos inmunes (<https://www.jax.org/strain/000485>). El uso de estos modelos ha permitido estudiar de manera controlada, rápida y eficiente ciertas características genéticas y fenotípicas específicas de LES, y los efectos de ciertas drogas en el tratamiento y terapia de la enfermedad (Maria et al., 2015; Rigby et al., 2006).

Relación entre prolactina y las enfermedades autoinmunes

Ha sido demostrado que las hormonas sexuales y hormonas relacionadas con ellas, como PRL, están implicadas en modular la respuesta inmune (Ben-Jonathan et al., 2008; Peeva et al., 2003; Venkatesh et al., 2006). Nuestro grupo de trabajo ha realizado aportes científicos sobre el rol de PRL en la regulación del sistema inmune demostrando que niveles de PRL disminuidos durante la lactancia disminuyen la cantidad de LT presentes en glándula mamaria (Mackern-Oberti et al., 2013). Otros estudios indican que en el timo, PRL tendría un rol sobre la diferenciación de LT promoviendo la sobrevida de timocitos CD4⁺CD8⁻ y su diferenciación a timocitos CD4⁺CD8⁺ (De Mello-Coelho et al., 1998). Además, se ha propuesto que PRL participaría en la activación de LT, principalmente incrementando la intensidad de la misma (Chavez-Rueda et al., 2005; Takizawa et al., 2005), y aumentando la

respuesta proliferativa de LT frente a mitógenos como así también la producción de IL-2 (Xu et al., 2010). En CDs, PRL aumenta la expresión de MHCII y CD40, y la producción de IL-6 e IL-12, promoviendo así su capacidad estimuladora de LT (Yang et al., 2006). Adicionalmente, PRL posee efectos antiapoptóticos sobre LB con un aumento en la producción de anticuerpos (Legorreta-Haquet et al., 2013; Peeva et al., 2003). Además, en LB inmaduros podría rescatar a las células de la apoptosis al estimular la vía antiapoptótica a través de JAK2/STAT3 (Flores-Fernandez et al., 2021).

La síntesis y secreción primordial de PRL es un proceso complejo que se produce en las células lactotropas de la glándula pituitaria anterior, y que está bajo el control de múltiples factores estimuladores e inhibidores (Grattan and Kokay, 2008). La dopamina secretada por neuronas hipotalámicas es el principal regulador negativo de la secreción de PRL por la pituitaria actuando sobre el receptor de dopamina inhibitorio D2 en la membrana de las células lactotropas (Bernard et al., 2015). PRL ejerce un efecto de retroalimentación negativa indirecta sobre su propia secreción actuando sobre neuronas hipotalámicas (Grattan and Kokay, 2008). Nuestro grupo de trabajo ha realizado numerosos aportes sobre la comprensión de los mecanismos reguladores de la producción de PRL a nivel de la glándula pituitaria durante la lactancia (Valdez et al., 2012; Valdez et al., 2007). Se ha demostrado también que PRL puede producirse en numerosos tejidos además de la glándula pituitaria, tales como decidua, glándula mamaria, ovario, próstata, testículo, linfocitos, células endoteliales, cerebro, piel y folículos pilosos, tejido adiposo y cóclea, pero su función a estos niveles todavía no está bien esclarecida (Ben-Jonathan et al., 1996; Bernard et al., 2015; Grattan and Kokay, 2008).

Se ha reportado una asociación entre hiperprolactinemia (hiperPRL) y enfermedades autoinmunes sistémicas (LES y Artritis Reumatoide), como así también con enfermedades autoinmunes específicas de órgano como la Diabetes Mellitus tipo 1, Tiroiditis de Hashimoto y Esclerosis Múltiple (Karimifar et al., 2013; Orbach et al., 2007; Paraiba et al., 2010; Rezaieyazdi and Hesamifard, 2006). Para el caso de LES, estudios preclínicos indican que una hiperPRL se correlacionaría con el grado de actividad de la enfermedad y con títulos elevados de autoanticuerpos (Rezaieyazdi and Hesamifard, 2006). Sin embargo otros estudios no lograron encontrar la misma asociación (Karimifar et al., 2013). En cambio, en modelos animales de LES se observó una correlación marcada entre los niveles de PRL circulante y la severidad de la enfermedad (Legorreta-Haquet et al., 2013; Venkatesh et al., 2006). Estudios preclínicos han reportado que el tratamiento con inhibidores farmacológicos de la liberación de PRL disminuye el número de recaídas en pacientes con LES, sugiriendo

así un rol importante de PRL en el desarrollo de autoinmunidad (Qian et al., 2015). Los mecanismos por los cuales una hiperPRL se asociaría al desarrollo de autoinmunidad no se conocen claramente y por ello es importante avanzar en el estudio de los efectos de PRL sobre LT.

Receptor de prolactina

Las acciones de PRL están mediadas por su receptor (PRL-R), el cual está formado por un dominio extracelular (DE), un dominio transmembrana (DT) y un dominio intracelular (DI) transductor de señales, el cual es altamente conservado entre especies (Bole-Feysot et al., 1998; Dagil et al., 2012). El gen del PRL-R contiene diferentes exones que por empalmes alternativos pueden generar diversas isoformas (Chen et al., 2020). Estas isoformas poseen un DE idéntico, pero difieren en el tamaño y la secuencia del DI, que puede ser corto, largo o intermedio presentando algunas diferencias entre humano y murino (Hu et al., 2001). La isoforma corta del PRL-R (PRL-RS) carece de parte del DI y por consiguiente no posee señalización intracelular (Hu et al., 2001). La isoforma larga del PRL-R (PRL-RL) se dimeriza en forma constitutiva y transmite una señal a través de proteínas citoplasmáticas asociadas luego de la unión de una sola molécula de PRL (Goffin et al., 1995). Por otro lado, heterodímeros de PRL-RL y PRL-RS son funcionalmente inactivos y no pueden conducir la transmisión de señales (Qazi et al., 2006) (figura 1). Además de las diferentes isoformas unidas a la membrana, podemos encontrar una isoforma soluble del PRL-R constituida solamente por la porción extracelular (Kline and Clevenger, 2001).

Es bien conocido que la señalización mediada por la unión de PRL con PRL-RL inicia diferentes eventos como la fosforilación y activación de JAK-2, Src, STAT5, PI3K/AKT, MAPK3 llevando a la transcripción de genes sensibles a PRL (Berlanga et al., 1997; Gouilleux et al., 1994). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, durante la lactogénesis, el señalamiento del PRL-RL en glándula mamaria es diferente al presente en hígado, y que PRL-RL se encuentra regulado de manera diferencial en hígado y glándula mamaria (Jahn et al., 1997; Varas and Jahn, 2005). Por lo tanto, de forma similar a lo que ocurre en glándula mamaria, la función del PRL-RL podría verse modificada durante la activación linfocitaria. Además, es de suma importancia el estudio del PRL-R en el sistema inmune dado que se han identificado polimorfismos asociados a este que podrían tener implicancias en el desarrollo de tumores e infertilidad (Bogorad et al., 2008; Newey et al., 2013).

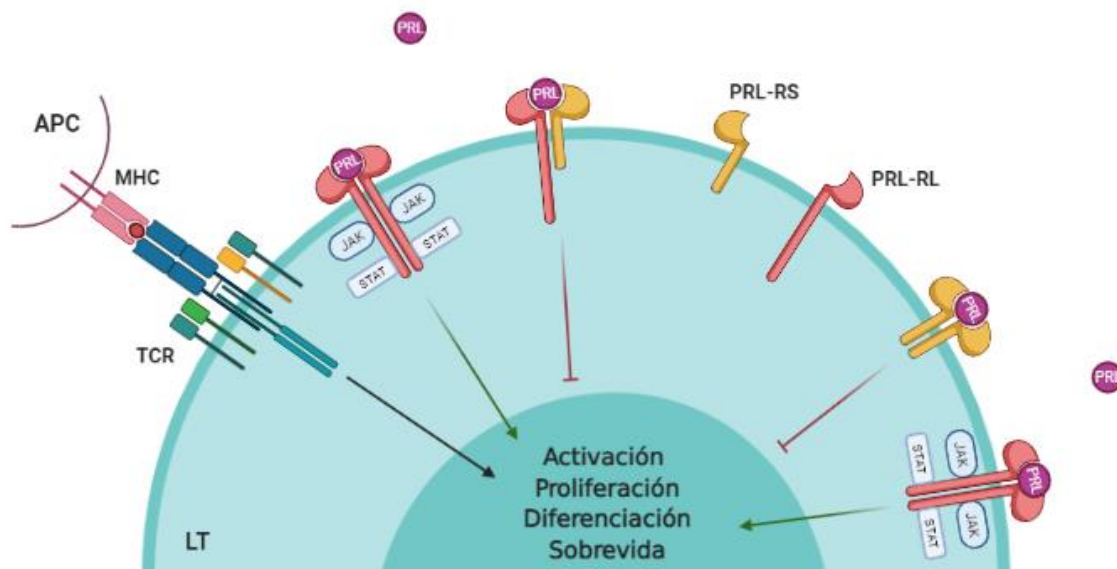


Figura 1. Acciones de PRL-RL y PRL-RS en presencia de PRL. Los LT son activados por las señales TCR al reconocer el péptido-MHC proveniente de una APC. Cuando esto ocurre y en el medio hay PRL, PRL-R se dimeriza para interactuar con PLR y activar diferentes vías de señalización, de la cual se destaca la vía JAK/STAT. Esta interacción estimula la activación, proliferación, diferenciación y sobrevida celular. Cuando los dímeros están formados por al menos una isoforma de PRL-RS, la señalización a través de STAT no se puede completar. LT: linfocito T, APC: Célula presentadora de antígenos, TCR: Receptor de LT, MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, PRL: prolactina, PRL-RL: Receptor de prolactina largo, PRL-RS: Receptor de prolactina corto. Creada con BioRender.com.

Las isoformas PRL-RS y PRL-RL se encuentran co-expresadas en diferentes tejidos incluyendo órganos linfáticos como timo y bazo siendo la isoforma PRL-RL la predominante (Clarke and Linzer, 1993; Flores-Fernandez et al., 2021; Nagano and Kelly, 1994). Utilizando anticuerpos contra el dominio extracelular del PRL-R que se unen a ambas isoformas indistintamente, se ha demostrado que monocitos, macrófagos, CDs, LT CD4⁺, LT CD8⁺, LTγδ, LB, NK, granulocitos y células epiteliales tímicas expresan el PRL-R (De Mello-Coelho et al., 1998; Dorshkind and Horseman, 2000; Nagano and Kelly, 1994; Urtishak et al., 2001). La regulación de las diferentes isoformas del PRL-R y su activación han sido estudiadas principalmente en el tracto reproductor femenino (Sangeeta Devi and Halperin, 2014). Sin embargo, la regulación de las diferentes isoformas de PRL-R en LT y LB durante enfermedades autoinmunes es completamente desconocida.

Teniendo en cuenta la asociación entre PRL y las enfermedades autoinmunes, la mayor incidencia de LES en el sexo femenino, y conociendo que las acciones de PRL están mediadas parcialmente por la presencia de las isoformas de su receptor, se podría

especular una regulación diferencial de las diferentes isoformas del PRL-R en LES. En cuanto a la isoforma PRL-RS, la cual carece de señalamiento, una menor expresión conduciría a un menor efecto sobre la modulación de la activación mediada por PRL/PRL-RL durante la activación de LT y LB. En individuos susceptibles, estas fallas en la regulación podrían favorecer el inicio y la progresión de patologías autoinmunes. Por el contrario, la inducción farmacológica del PRL-RS podría suprimir respuestas inflamatorias exacerbadas siendo una potencial estrategia terapéutica para las enfermedades autoinmunes. En cuanto a la isoforma PRL-RL, una mayor expresión resultaría en un aumento de la sensibilidad a PRL favoreciendo sus efectos sobre la propia célula. Teniendo en cuenta que el PRL-R puede formar heterodímeros entre ambas isoformas, la relación PRL-RL/PRL-RS tiene un gran impacto sobre el destino final de su activación.

Evolución del gen del receptor de prolactina

El PRL-R es parte de la superfamilia de receptores de citoquinas/hematopoyéticos de tipo I (Ocampo Daza and Larhammar, 2018; Peeva and Zouali, 2005). Los receptores de esta superfamilia comparten similitudes que incluyen dos pares de cisteínas unidas por puentes disulfuro y el motivo WSXWS en el DE y otras regiones conservadas en el DI (Bole-Feysot et al., 1998; Bouilly et al., 2012; Dagil et al., 2012; Goffin et al., 1995; Rozakis-Adcock and Kelly, 1991, 1992). El gen de PRL-R se ubica en el cromosoma 5 en humanos y tiene 210 residuos en el DE, 24 residuos en el DT y, dependiendo de la isoforma generada, varía la cantidad de residuos del DI (Ben-Jonathan et al., 2008; Hu et al., 2001).

Se sabe que PRL, la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario (entre otras hormonas) y sus receptores surgieron como resultado de la duplicación de genes y la divergencia temprana en la evolución de los vertebrados (Forsyth and Wallis, 2002). La tasa evolutiva es la velocidad a la que una población adquiere mutaciones que se fijan en ella y la diferencia del resto de su especie. La evolución de estos receptores ha sido investigada parcialmente, pero se observa una tasa de cambio evolutivo basal lento en mamíferos, con ciertos episodios de evolución acelerada (Forsyth and Wallis, 2002; Ocampo Daza and Larhammar, 2018). El gen del PRL-R se ha estudiado dividiendo los datos de su secuencia en cuatro subconjuntos que representan cuatro regiones funcionales: péptido señal (PS), DE, DT y DI. Al calcular las tasas de sustitución de aminoácidos del DE mediante mapeo filogenético y filogenia con tiempos de divergencia alternativos se observa que durante la evolución de los primates, roedores y rumiantes las tasas aumentaron notablemente en relación al PRL-R de cerdos (Li et al., 2005). Esto se correlaciona altamente con el patrón

evolutivo episódico para la PRL de mamíferos ya que en la mayoría de los casos evolucionó muy lentamente, pero durante la evolución de los primates, roedores y rumiantes mostró aumentos sustanciales en la tasa de evolución (Wallis et al., 2001). Para el PS y el DT no se encuentra evolución episódica en relación a la evolución del gen de PRL, mientras que el DI muestra una evolución episódica similar a la del DE, pero menos marcada (Li et al., 2005). La coevolución se confirmó a través de pruebas de evolución correlacionada, en donde las secuencias de aminoácidos de PRL-R se emparejaron con las de PRL de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada. Estos análisis demostraron una coevolución altamente correlacionada entre PRL y el DE del PRL-R, además de la coevolución entre los dominios DE y DI del PRL-R (Li et al., 2005). Estos episodios de rápida evolución ocurrieron durante un corto período. En los primates ocurrió antes de la división de los monos del Viejo Mundo y los monos del Nuevo Mundo, y en roedores ocurrió antes de la divergencia del ratón y la rata (Li et al., 2005). Aunque la base de estos cambios no se conoce con precisión, estos resultados parecen reflejar cambios adaptativos. Los cambios evolutivos funcionales, es decir aquella evolución definida a escala orgánica, que implican la interacción entre un ligando y su receptor pueden afectar la afinidad y/o especificidad del mismo. Aunque el aumento de la afinidad podría proporcionar una base para una interacción más efectiva, es poco probable que esta sea un factor limitante para determinar la efectividad de la PRL en mamíferos. Por otro lado, los cambios en la especificidad podrían proporcionar una base más plausible para la evolución episódica, especialmente si se asocia con la aparición de hormonas relacionadas y/o cambios en la importancia relativa de los diferentes efectos de PRL mediados por diferentes receptores (Li et al., 2005). Sin embargo, la correlación entre evolución molecular y funcional de estas hormonas es incompleta, y es probable que muchas adaptaciones funcionales importantes implicaran cambios en los elementos reguladores ya sea alterando el tejido de origen o el procesamiento postranscripcional, en lugar de cambiar las estructuras de las proteínas (Forsyth and Wallis, 2002). Resulta interesante que para cada uno de los linajes en los que se observaron estallidos de rápida evolución de PRL-R, se ha informado un grupo de genes similares a la hormona del crecimiento o PRL, incluidos los genes para el lactógeno placentario, en lugar de un solo gen PRL hipofisario. Grupos de genes similares a PRL se encuentran en roedores y rumiantes (Forsyth and Wallis, 2002) y un grupo de genes similares a la hormona del crecimiento se encuentra en primates superiores (Forsyth and Wallis, 2002; Golos et al., 1993; Wallis et al., 2001). Los lactógenos placentarios parecen utilizar la vía de señalización PRL-R (Biener et al., 2003; Golos et al., 1993; Herman et al.,

2000) como la PRL hipofisaria. Esto podría sugerir que la evolución episódica observada para el PRL-R refleja la adaptación a la presencia de múltiples ligandos. Sin embargo, en primates y rumiantes al menos este episodio precedió a las duplicaciones que dieron lugar a lactógenos placentarios (Wallis, 1996; Wallis et al., 2001). La interacción entre PRL y PRL-R para proporcionar la dimerización del receptor necesaria para la función biológica es muy débil cuando solo se estudia el DI del receptor (Bignon et al., 1994; Gertler et al., 1996) y puede ser estabilizada o modificada por interacciones entre los DI de las dos moléculas receptoras. Siendo así, el DI contribuye a las interacciones hormona-receptor, además de mediar la señalización intracelular. Lo previamente expuesto podría entonces explicar la coevolución entre PRL, el DE y el DI.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos preguntamos si las células del sistema inmune pueden modular la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R, y como consecuencia regular sus efectos en las ocasiones donde se las requiera. De forma similar, dado que LES se vincula con un estado hiperprolactinéxico en un tercio de los pacientes, nos preguntamos si la expresión del PRL-R está alterada en LES y si éste podría ser utilizado como biomarcador.

Hipótesis

Existe una expresión diferencial del PRL-R en linfocitos de individuos sanos en relación a individuos susceptibles a LES que podría afectar la funcionalidad de estas células durante la autoinmunidad.

Objetivo general

Evaluar la expresión de PRL-R y sus isoformas en células inmunes de individuos sanos y lúpicos en estado basal, y luego de su activación e inhibición.

Objetivos específicos

1. Estudiar la expresión de ARNm del PRL-R en células inmunes murinas.
2. Evaluar la modulación de ARNm/proteína del PRL-R en esplenocitos murinos luego de la activación e inhibición.
3. Evaluar la expresión de ARNm/proteína del PRL-R en esplenocitos de ratones con LES.
4. Estudiar la expresión génica y de ARNm del PRL-R en individuos sanos y pacientes con LES.

Materiales y Métodos

Pacientes con LES

Los pacientes fueron enrolados por médicos reumatólogos y bioquímicos del Hospital Central (Mendoza, Argentina), con quienes tenemos una colaboración científica formal con protocolo experimental no intervencionista aprobado por el Comité de docencia e investigación del propio nosocomio.

Elegibilidad de los Pacientes: se incluyeron 10 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y no presentaron ninguno de los criterios de exclusión mencionados en las próximas secciones. Todos los pacientes incluidos en el ensayo fueron comunicados de los objetivos y pertinencias del ensayo, del destino de sus muestras y los datos obtenidos. Posterior a eso, cada sujeto accedió de manera no obligatoria a firmar un consentimiento informado detallado (Anexo 1).

Criterios de Inclusión: Mujeres mayores de 18 años y menores de 65 años. Pacientes que cumplan con los criterios revisados en 1982 del *American College of Rheumatology* para el diagnóstico del LES y Artritis Reumatoide.

Criterios de Exclusión: Diagnóstico concomitante de otra enfermedad autoinmune como, pero no exclusivamente, Esclerosis Múltiple, Diabetes Mellitus tipo 1 y Esclerodermia. Diagnóstico concomitante de alguna enfermedad crónica como Diabetes Mellitus tipo 2, Insuficiencia Renal Crónica, Cirrosis Hepática, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, tumores sólidos y/o neoplasias hematológicas, insuficiencia cardíaca y limitación crónica del flujo aéreo. Embarazo.

Grupo Control: Se incluyeron 5 individuos saludables del sexo femenino mayores de 18 años y menores de 65 años con el objetivo de comparar los resultados obtenidos de pacientes con LES.

Todos los procedimientos experimentales que involucran el estudio realizado con muestras humanas fueron avalados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, N° Resolución 23404/2016.

Muestras de sangre humana

Se utilizaron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana de individuos sanos (grupo control) y pacientes con LES. Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción venosa y recolectadas en 6 tubos heparinizados alcanzando un

volumen total de 40ml por muestra. Posteriormente la sangre fue diluida a la mitad (1:1) en solución fisiológica estéril. Se vertieron delicadamente 10ml de la sangre diluida a 4 tubos cónicos convencionales de 15ml que contenían 3ml de Ficoll-Hypaque previamente cargado. Estos tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente durante 20 minutos a 1800 rpm. Luego, la fracción de células mononucleares fue recolectada cuidadosamente utilizando pipetas Pasteur de plástico estériles. Estas células recolectadas fueron lavadas con PBS y posteriormente utilizadas para purificar ARN total.

Animales de experimentación

El uso de los animales de experimentación con los cuales se trabajó en la presente tesis se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en donde desarrollé unas pasantías de investigación durante los años 2016 y 2018 bajo la dirección del Dr. Alexis Kalergis.

Se utilizaron ratones hembras de las cepas C57BL/6 (C57) como cepa control (n=12), y tres cepas de ratones que desarrollan espontáneamente LES con la edad mediante mecanismos patogénicos diferentes:

- i) Ratones B6;129S-*Fcgr2b*^{tm1^{Ttk}/J} (RIIb) cuyo mecanismo patogénico se basa en la pérdida de tolerancia periférica de LB por la ausencia del receptor inhibidor FcγRIIb el cual es expresado principalmente en LB, monocitos y CD (n=12);
- ii) Ratones B6;NZM-*Sle1*^{NZM2410/Aeg} *Sle2*^{NZM2410/Aeg} *Sle3*^{NZM2410/Aeg}/LmoJ (NZM) cuya patogénesis autoinmune se basa en portar tres alelos lúpicos, Sle1.Sle2.Sle3 con una alta penetrancia fenotípica donde LT CD4⁺ y LB participan activamente en la patogénesis lúpica (n=12);
- iii) Ratones MRL/MpJ-Fas/*pr* (FAS) que poseen el gen FAS mutado espontáneamente presentando una falla en los mecanismos de tolerancia central tímica principalmente dirigida por LT (n=12).

Los animales tenían 16 (FAS) y 20 (C57, RIIb, NZM) semanas de edad al momento de ser eutanasiados. Los animales se adquirieron en *The Jackson Laboratory* y se trasladaron al Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile en donde se generaron las respectivas colonias. Estas fueron mantenidas bajo condiciones de agua y comida *ad libitum*, temperatura de 23°C y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron supervisados diariamente por personal capacitado hasta que cumplieron la edad experimental requerida. Las condiciones ambientales y de manejo de todos los animales alojados en el Bioterio Central estuvieron en concordancia con *The*

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8ª edición y las normativas vigentes de cada institución. Todos los procedimientos experimentales que comprendieron el uso de animales y riesgos biológicos fueron aprobados por el Comité de Bioética Científica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CBB-245/2012). La eutanasia de los animales se llevó a cabo aplicando una sobredosis anestésica de ketamina-xilacina 80ml/10ml/kilo, seguida de dislocación cervical.

Medición de parámetros asociados con LES

Para corroborar que las cepas de ratones RIIb, NZM y FAS en nuestras condiciones experimentales desarrollaban la enfermedad, se analizaron distintos parámetros asociados con la patología del LES, como la proteinuria, el índice esplénico y la medición de Ac anti ADN.

Proteinuria

La medición de proteinuria se realizó el día previo a la eutanasia de los animales. Para obtener un valor semicuantitativo de la cantidad de proteínas presentes en la orina de cada ratón se utilizaron tiras reactivas para uroanálisis de la marca VET-10, lote 4590, sobre las cuales se colocó una gota de orina fresca. Luego de 5 segundos se comparó el color de la tira reactiva con el patrón provisto por el fabricante. Se asignó a cada valor de proteinuria una puntuación para facilitar la lectura y el análisis los resultados. La puntuación comprendió valores de cero a cuatro (0-4), siendo 0= negativo, 1= 0-30mg/dl, 2=30-300mg/dl y 3=<300mg/dl.

Índice esplénico

El índice esplénico es un parámetro útil que indica el aumento de peso del bazo en relación al peso corporal de cada animal. Para realizar el cálculo de índice esplénico se pesó a cada animal en balanza (Sartorius AY616) el día previo a la eutanasia. Así mismo, después de la eutanasia se realizó el pesaje del bazo en una balanza milimétrica (Sartorius Werke GMBH). El índice esplénico se obtuvo calculando la relación entre el peso corporal y el peso del bazo del mismo animal multiplicado por 100.

Anticuerpos anti ADN

El día previo a la eutanasia se extrajo sangre de los animales de experimentación a través de la zona maxilar. Se aplicó etanol al 70% para limpiar la zona y luego se realizó un pinchazo que permitió la extracción y recolección de 150µl de sangre en tubos eppendorf sin

anticoagulante. Se dejó coagular y luego se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para separar el suero. Los sueros fueron conservados a -20°C y luego utilizados para la medición de Ac anti ADN.

Se obtuvo una medida cualitativa de la cantidad de Ac anti ADN presentes en el suero de los ratones por medio de un ensayo directo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Para ello placas SPL Life Science de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 100µl de ADN comercial *Calf Thymus DNA* D4522, en una concentración final de 15µg/ml e incubadas a 4°C durante toda la noche. Entre cada etapa del ELISA se realizaron cinco lavados con 200µl de PBS-Tween al 0.05%. Se bloqueó la placa con 200µl de PBS-FBS al 10% y se la dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100µl de las muestras del suero de ratón en una dilución de 1/400 en PBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución de 1/2000 en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y media. Finalmente se agregaron 100µl del sustrato TMB (Sigma-Aldrich™) y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. Se frenó la reacción enzimática agregando 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N y se determinó la densidad óptica (OD) en un lector de placas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) usando un filtro de 450 nm.

Cultivo in vitro de esplenocitos

Cumplida la edad requerida se eutanasió a los animales (n=6 en cada grupo, 2 repeticiones del experimento) mediante una sobredosis de ketamina/xilacina y posterior dislocación cervical. El resto de los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad. Se abrió la cavidad abdominal con tijeras para extraer el bazo asépticamente. Se colocaron los bazos en placas de Petri que contenían 3ml de RPMI 1640 (Gibco®) y se homogeneizaron con émbolos de jeringa sobre filtros de 70µm Cell Strainer SDL (Life Science). Se recuperaron las células en tubos de 50ml (BIOFIL) y se centrifugaron a 1900 rpm durante 5 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, se resuspendieron los pellets en 25ml de buffer de lisis ACK (NH₄Cl 144 mM, KHCO₃ 1 mM) por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 25ml de PBS para frenar la reacción del ACK y se centrifugaron los tubos a 1900 rpm durante 5 minutos. Finalmente se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 1ml de RPMI 1640 suplementado con glutamina 4 mM, NaHCO₃ 24 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, y 10% de suero fetal bovino (FBS). Se realizó el recuento celular con coloración vital de Azul de Tripán (Gibco®) en un contador automático de células TG20 (BIO-RAD).

Una cantidad de 25×10^6 de células por pocillo se cultivaron en 1ml de medio RPMI 1640 suplementado en placas de 12 pocillos durante 24 horas a 37°C y 5% dióxido de carbono. Las células se cultivaron por duplicado en condición basal (sin agregado de estímulos), con el agregado de 1µg/ml de Concanavalina A (Sigma Aldrich C2272) y/o con el agregado de 1µg/ml de Dexametasona (Sigma-Aldrich 265005). Pasadas las 24 horas se levantaron las células del cultivo para continuar con los procedimientos experimentales detallados a continuación.

Determinación de ARN mensajero mediante qPCR

El ARN total se obtuvo a partir de esplenocitos utilizando TRIZOL (Gibco®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN total aislado se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y la concentración de ARN se determinó mediante cuantificación en NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific).

Un µg de ARN de las muestras de esplenocitos se retrotranscribió mediante una reacción de RT-PCR utilizando el Kit comercial iScript One Step cDNA. Una vez obtenidas las muestras de ADN copia, equivalentes a 0,05 µg de ARN inicial, fueron sometidos a una qPCR llevada a cabo durante 40 ciclos en un Corbett Rotor-Gene 6000 para amplificar de manera específica el gen que por empalme alternativo da origen a las diferentes isoformas del receptor de PRL y los correspondientes controles de carga (Tabla 1). Las muestras se corrieron por triplicado y se utilizó un control sin templado, también por triplicado. Cada una de las reacciones se llevó a cabo con una serie de condiciones de tiempos y temperaturas, como se observa en la Tabla 1. Los productos de la qPCR se analizaron en geles de agarosa al 2% para confirmar la presencia de un único producto de amplificación. Cada ensayo de qPCR incluyó un control positivo que consistió en una muestra de hígado (órgano con abundante cantidad de PRL-R), un control negativo y un control que carecía de muestra. La cuantificación en tiempo real se monitorizó midiendo el aumento en la fluorescencia causada por la unión del colorante EvaGreen (Biotium, US) al ADN de doble cadena al final de cada ciclo de amplificación. El análisis y cuantificación de los resultados se llevó a cabo utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ en donde se normalizó la expresión génica de las isoformas de PRL-R con el gen control de Glicer aldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) en el caso de muestras murinas y con los genes de la β -ACTINA y EEA1S1 para las muestras de origen humano. El programa que se utilizó para el análisis de los productos de qPCR fue el Rotor Gene 6000 Series Software 1.7.

Tabla 1: *Primers utilizados para qPCR y condiciones de la reacción.*

Gen	Secuencia de primers	Condiciones de qPCR
GAPDH ratón	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAG Reverse: GGATGCAGGGATGATGTTT	95°20' – 60°20' – 72°30'
PRL-RL ratón	Forward: AAGGAGTATGCCAAGGTATCT Reverse: GTTCTGTTCAAGCGATGGT	95°20' – 49,69°25' – 72°30'
PRL-RS3 ratón	Forward: ATAAAAGGATTGATACTCATCTGCTAGAG Reverse: AGTCCCCTTCATTGTCCAGTTT	95°20' – 54,82°20' – 72°30'
β-ACTINA humana	Forward: AAAGACCTGTACGCCAACAC Reverse: GTCATACTCCTGCTTGCTGAT	95°30' – 60°30' – 72°30'
EEA1S1 humana	Forward: TGTCGTCATTGGACACGTAGA Reverse: ACGCTCAGCTTTTCAGTTTATCC	95°15' – 57°30' – 72°30'
PRL-RL humano	Forward: CCTTGTCAGGTTTCGCTGCAAA Reverse: AGATGAGCATCAAATCCTTTTA	95°30' – 60°30' – 72°30'
PRL-R1b humano	Forward: TAAATGGTCTCCACCTACCCTGAT Reverse: CACCTCCAACAGATGAGCATCAAATCC	95°30' – 60°28' – 72°30'

Validación de los productos de qPCR de las isoformas de PRL-R

Para corroborar la identidad de los productos de amplificación de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas, se secuenció por el método de Sanger el producto obtenido en ambas reacciones de PCR. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de Análisis de ADN de la Facultad de Ciencias Médicas – UNCuyo. Los análisis en *Sequencing analysis* muestran las secuencias obtenidas para los fragmentos amplificados con los primers provistos. Estas secuencias se analizaron luego en la base de datos BLAST para verificar la homología con las secuencias de los transcritos de PRL-R respectivos.

Determinación de ARNm de PRL-RL y PRL-RS en poblaciones celulares purificadas por Cell Sorting

Para evaluar la expresión de ARNm en poblaciones celulares, los ratones se eutanasiaron, se extrajeron los bazos y los esplenocitos se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 1500 rpm) luego de un lavado de 5 minutos con ACK a temperatura ambiente. Los esplenocitos se resuspendieron en PBS/FBS al 2% y se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti CD4-PECy7, anti CD8-FITC y anti CD19-PE. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 5 ml de PBS y se sortearon en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD Biosciences). Las distintas poblaciones celulares se recolectaron en PBS/FBS al 2% y luego se procedió a la obtención de ARNm utilizando TRIZOL (Gibco®) tal como se describe en la sección anterior.

Determinación de PRL-R mediante citometría de flujo

Para evaluar la expresión de PRL-R en esplenocitos, los ratones se eutanasiaron, se extrajeron los bazos y los esplenocitos se cultivaron en las condiciones antes mencionadas (n=6 en cada grupo, 2 repeticiones del experimento). Las células se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 1500 rpm), se resuspendieron en PBS/FBS al 2% y se tiñeron con los siguientes anticuerpos específicos: Viab-APCCy7, CD3-APC, CD4-PECy5, CD8-PECy7, CD19-PE, FOXP3-PE, Anti-Prolactin Receptor/PRLR antibody [U5] (ab2772) hecho en cabra y FITC-anti-cabra IgG. Para la tinción con FOXP3-PE, las células se fijaron y permeabilizaron luego de la tinción extracelular con Paraformaldeído al 4% durante 20 minutos. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 100µl de PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos obtenidos se analizaron utilizando FlowJo V.10.0.7. (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Para discriminar entre células individuales y dobletes o restos celulares, los eventos se seleccionaron secuencialmente mediante dos parámetros representados por SSC-A y FSC-A, FSC-W y FSC-H, SSC-W y SSC-H.

Análisis estadístico

De acuerdo a las características de los datos obtenidos, se evaluó su significancia estadística recurriendo a *tests* paramétricos y no paramétricos, utilizando los programas Prism GraphPad versión 7.00. e InfoStat. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA), o “t test” de acuerdo a las características de cada experimento. Cuando ANOVA reveló diferencias estadísticas, aplicamos el análisis de

comparación de medias a posteriori (*post-hoc*) Fisher LSD. Cuando las variaciones no fueron homogéneas, se realizó una transformación logarítmica de los datos. En los casos en que las varianzas no se homogeneizaron, se utilizaron test no paramétricos para el análisis. Los datos se presentaron como la media $\pm$ s.e.m. Las diferencias entre las medias a partir del valor de $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas e identificadas en las gráficas con * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Análisis Bioinformático desarrollado en R

El análisis bioinformático sobre la expresión de PRL-R en medicina humana se realizó en colaboración científica con el Dr. Felipe Carlos Martín Zoppino y el Bioquímico Juan Manuel Fernandez-Muñoz, ambos especialistas en el campo de la bioinformática y análisis in silico. Para realizar el estudio bioinformático de PRL y PRL-R se utilizó un dataset de expresión génica proveniente del repositorio “Gene Expression Omnibus” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE121239>), el cual se descargó programáticamente utilizando el paquete de Bioconductor “*GEOquery*” (Davis and Meltzer, 2007). Se obtuvieron los datos de expresión de ARNm de 20 individuos sanos y 292 pacientes con LES (Petri et al., 2019; Toro-Dominguez et al., 2018). Estos datos fueron normalizados y posteriormente se seleccionaron 85 genes de interés relacionados a LES, receptores hormonales, cascadas de señalización de PRL/PRL-R, proliferación y apoptosis (AlFadhli et al., 2016; Cao et al., 2019; Jones et al., 2019; Mehrian et al., 1998; Recalde et al., 2018), como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Genes utilizados para el análisis transcriptómico.

Gene	Función	Asociación LES	Tipo de Asociación
BTN3A3	Activación de LT	Si	Aumentado
ITGAM	Adherencia al endotelio. Fagocitosis a través del complemento	Si	Mutación SNP
CDH24	Adhesión célula a célula	Si	Sobreexpresado
OSCAR	Adhesión de monocitos	Si	Polimorfismo
BCL2L1	Anti/proapoptótica de acuerdo a la isoforma	No	
BCL2	Antiapoptótico	Si	Sobreexpresado
AXL	Antiapoptótico	Si	Aumentado
PRDM1	Antiapoptótico	Si	Aumentado
TIMP2	Antiproliferativo. Degradación de la matriz extracelular	Si	Aumentado
IFNA1	Antiviral, antiproliferativo e inmunomodulador	Si	Aumentado
CASP9	Apoptótico	No	

Gene	Función	Asociación LES	Tipo de Asociación
FAS	Apoptótico	Si	Polimorfismo
FASL	Apoptótico	Si	Polimorfismo
CD36	Apoptótico. Transporte de ácidos grasos	Si	Sobreexpresado
CHRNA4	Canal iónico	No	
B2M	Componente del MHC I	Si	Aumentado
IRF5	Crecimiento celular. Diferenciación. Apoptosis.	Si	Polimorfismo
IL12	Desarrollo de células Th1. Mantenimiento de Th1 memoria/efectoras	Si	Aumentado
ATR	Detección del daño de ADN	Si	Pérdida de función
SBK1	Dominio de unión a quinasa 1	No	
APOBEC3G	Enzima de edición del ARN	Si	Aumentado
CD22	Esencial para mantener la autotolerancia	Si	Deficiente/Ausente
TNFAIP6	Estabilidad de la matriz extracelular. Migración celular	Si	Polimorfismo
JUN	Factor de transcripción	Si	Polimorfismo
NFKB1	Factor de transcripción	Si	Polimorfismo
PIK3CA	Factor de transcripción	Si	Mutación
STAT3	Factor de transcripción	Si	Aumentado
STAT5A	Factor de transcripción	Si	Sobreactivado
FCGR2B	Fagocitosis de complejos inmunes y regulación de producción de anticuerpos	Si	Disfunción
RAMP1	Glicosilación terminal, maduración y presentación del receptor de calcitonina a la superficie celular	Si	Disminuido
DDX5	Helicasa de ARN. Traducción. Empalme nuclear y mitocondrial. Ensamblaje de ribosomas y espicosomas	No	
LTB	Inflamatorio. Participa en el desarrollo del tejido linfoide.	Si	Aumentado su receptor
IL10RA	Inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias.	Si	
CTLA4	Supervivencia celular	Si	Polimorfismo
CASP8	Inhibición de la función de LT	Si	Alelo g
IL10	Iniciadora y efectora de apoptosis, necrosis e inflamación	No	
CD200	Inmunoregulación e inflamación. Supervivencia, proliferación y producción de anticuerpos	Si	Ac anti IL-10
SLC4A1	Inmunosupresor y antitumoral	Si	Aumentado
GAPDH	Intercambiador de aniones en eritrocitos	No	
CYP1A1	Metabolismo de carbohidratos, fosforilación oxidativa. Constitutiva	No	
METTL6	Metabolismo de fármacos y síntesis del colesterol, esteroides y otros lípidos. Citocromo P450	Si	Polimorfismo
	Modificaciones de ARN. Regulación de crecimiento celular	No	

Gene	Función	Asociación LES	Tipo de Asociación
ACTB	Motilidad, estructura e integridad celular	No	
	Movilidad celular. Remodelación tisular.		
MMP9	Degradación de colágeno	Si	Sobreactivado
CD55	Previene daño de las células huésped	Si	Suprimido
	Progesterona. Establecimiento y mantenimiento del embarazo	No	
PGR		No	
IL17	Proinflamatorio	Si	Aumentado
IFNG	Proinflamatorio	Si	Aumentado
FCER1G	Proinflamatorio	No	
	Proinflamatorio. Proliferación y diferenciación celular.	Si	Polimorfismo
NR3C1		Si	
MKI67	Proliferación celular	Si	Aumentado
IL2	Proliferación de LT y LB	Si	Ac anti IL-2
IL4	Proliferación de LT y LB	Si	Polimorfismo
	Proliferación de sinoviocitos asociada en artritis inducida por colágeno 1	No	
SAAL1		No	
	Proliferación. Apoptosis. Respuesta al daño del ADN. Supresor de tumores	Si	Aumentado
IRF1		Si	
MZB1	Proteína de células B1 y de zona marginal	Si	Aumentado
TLR9	Receptor de ADN	Si	Sobreexpresado
TLR7	Receptor de ARN	Si	Sobreexpresado
ESR1	Receptor de estrógeno nuclear		
ESR2	Receptor de estrógeno nuclear		
PRLR	Receptor de PRL	No	
	Receptor de progesterona. Establecimiento y mantenimiento del embarazo	No	
PRB		No	
	Receptor de quimiocinas para HIV Humana tipo 1 y 2	Si	Aumentado
GPR15		Si	
	Receptor de reconocimiento de patrones. Asociado a nefritis lúpica		
CLEC7A			
THRA	Receptor tiroideo alfa	No	
THRB	Receptor tiroideo beta	No	
MARCO	Receptor de macrófagos. Antimicrobiano	Si	Disminuido
	Reclutamiento de linfocitos y CD a los tejidos linfoides	No	
CCR7		No	
CDK	Regulación del ciclo celular	Si	Sobreexpresado
CDK2	Regulación del ciclo celular	Si	Sobreexpresado
	Regulación del ciclo celular. Respuesta al estrés genotóxico	No	
MAPK14		No	
FOXP3	Regulación del desarrollo y función de LTreg	No	
	Regulación del desarrollo. Activación, crecimiento y motilidad celular	Si	Sobreexpresado
CD53		Si	
	Regulación inmune. Diferenciación de T CD4+ a LTreg	Si	Sobreexpresado
PDCD1		Si	
PCNA	Reparación del ADN	Si	Ac anti PCNA

Gene	Función	Asociación LES	Tipo de Asociación
PRL	Reproducción. Lactancia. Metabolismo. Regulación inmune	Si	Aumentado
SLC41A3	Sistema de eflujo mitocondrial de Mg ²⁺	No	
PSMB8	Subunidad del Inmunoproteosoma	Si	Polimorfismo
EVL	Sustrato para el receptor del factor de crecimiento epidérmico	No	
ESP8L1	Sustrato para el receptor del factor de crecimiento epidérmico	No	
CXCR5	Tráfico de LT a ganglios linfáticos	Si	Disminuido
REEP5	Tráfico intracelular. Mejorar la actividad de receptores acoplados a proteína G.	No	
HPRT1	Transferasa. Generación de nucleótidos de purina	No	
ABCA1	Transportador celular de lípidos	Si	Ac anti-ABCA1
GBP1	Unión al guanilato inducido por IFN	Si	Aumentado

Análisis de clusters y Heatmap

Una vez obtenida la matriz de expresión, la filas y columnas fueron ordenadas en base a un análisis de agrupamiento jerárquico, que se utilizó como métrica para medir las distancias a los coeficientes de correlación de Pearson. Para la elaboración del heatmap, se utilizó el paquete “*GPlots*” y se eligió la escala Verde-Negro-Roja para representar bajos, medios y altos niveles de expresión génica, respectivamente.

Análisis de Expresión Diferencial

Para realizar el análisis de expresión diferencial, dividimos a los 292 pacientes con LES en dos grupos, teniendo en cuenta el análisis de clusters realizado. El perfil de expresión de 20.742 genes de ambos grupos de pacientes con LES fue comparado con el grupo de pacientes sanos. Para esto, se utilizó el paquete de Bioconductor “*Limma*” (Ritchie et al., 2015). Como resultado del análisis se obtuvieron los valores de cambio de expresión (*fold-change*) asociados a los valores P y valores P ajustados. Estos últimos se utilizaron para corregir eventuales falsos positivos.

Análisis de Correlación

Utilizando la misma matriz de expresión y dividiendo la cohorte en individuos con LES e individuos sanos, realizamos un análisis de correlación de Pearson entre los niveles de expresión de PRL, PRL-R y un grupo de genes que forman parte de dos vías moleculares de interés, STAT5 (JAK2, STAT5A, STAT5B, PCNA, MKI67 y MKI67IP) y STAT3 (JAK2,

STAT3, MCL1, BIRC5, BCL2 y BCL2L1). Los coeficientes de correlación obtenidos, junto a los diagramas de dispersión, las rectas de regresión lineal y los histogramas para evaluar la distribución de los datos, fueron graficados utilizando el paquete de Bioconductor “*GGplot*”.

Resultados

Objetivo 1: Expresión de ARNm de PRL-R en células inmunes murinas

Expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-RS en esplenocitos y poblaciones linfocitarias murinas

Con el objetivo de evaluar la presencia de ARNm del PRL-R en esplenocitos murinos realizamos ensayos de PCR en los esplenocitos y en células de tejidos que expresan las isoformas del PRL-R en abundancia. Esto nos permitió tener un control positivo y confirmar el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa. Para ello, utilizamos ARN de esplenocitos, hígado y ovario de ratones C57 como controles positivos. Como se puede observar en la figura 2, se identificó la presencia de ARNm de las isoformas larga y corta del PRL-R en esplenocitos murinos. Este resultado está de acuerdo con reportes previos en los que se reportó evidencia de estas isoformas en células inmunes (Clarke and Linzer, 1993; Nagano and Kelly, 1994).

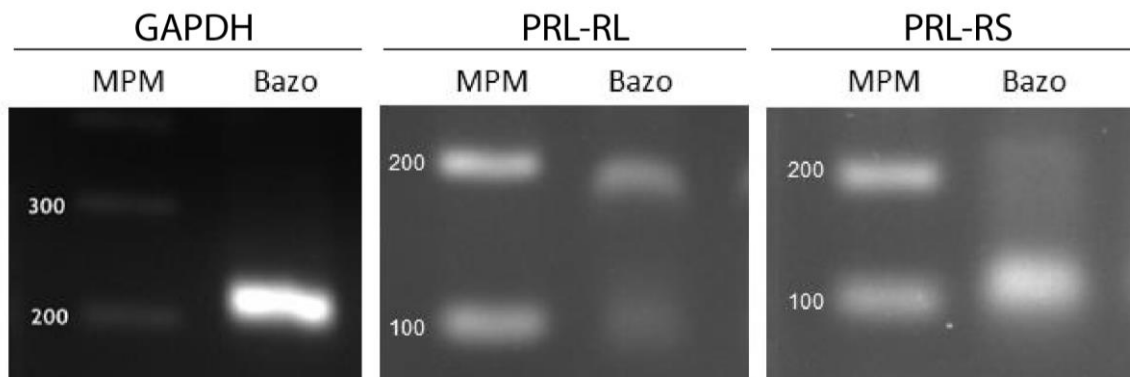


Figura 2. Evaluación por PCR y posterior gel de agarosa de la expresión de ARNm de PRL-RL y PRL-RS en esplenocitos murinos de ratones C57. Control de Carga: GAPDH (Glicerilaldehído 3 fosfato deshidrogenasa); MPM: marcador de peso molecular.

Posteriormente, para identificar la expresión de ambas isoformas en las diferentes subpoblaciones linfocitarias evaluamos la presencia de ARNm de PRL-RL y PRL-RS en LT CD4⁺, LT CD8⁺ y LB CD19⁺ previamente purificados por *cell sorting* (figura 3.A). Las poblaciones celulares enriquecidas fueron sometidas a los pasos de purificación de ARNm y posterior RT-PCR descritos previamente. Como se puede observar en la figura 3.B., las

poblaciones linfocitarias purificadas presentaron una leve expresión de PRL-RL. Por el contrario, no logramos identificar la presencia del producto de PRL-RS en los linfocitos purificados con la metodología utilizada (dato no mostrado). Esta diferencia en la expresión de PRL-RS observada entre la muestra de bazo y las tres poblaciones linfocitarias purificadas podría deberse a la baja expresión de esta isoforma y a las diferentes formas de obtención de la muestra. Para la purificación de células por FACS, éstas deben ser marcadas, adquiridas y separadas a una gran velocidad de flujo para luego obtener el ARN necesitando más de 10h para todo el proceso junto con cuatro rondas de lavado y centrifugación. Por el contrario, la obtención de la muestra de ARN se realiza de manera inmediata una vez obtenido el bazo del animal con una sola ronda de lavado y centrifugación. La diferencia en la expresión del PRL-RS también podría deberse a otras células inmunes no purificadas pero presentes en bazo como macrófagos, CD₄⁺, linfocitos NK u otras células mieloides. Debido a que la frecuencia de estas últimas células en bazo es muy baja (Mebius and Kraal, 2005) y esto dificulta la eficiencia de separación, se decidió no purificarlas. Como control de tejido que expresa PRL-R se utilizaron muestras murinas de hígado y de ovario (figura 3.B).

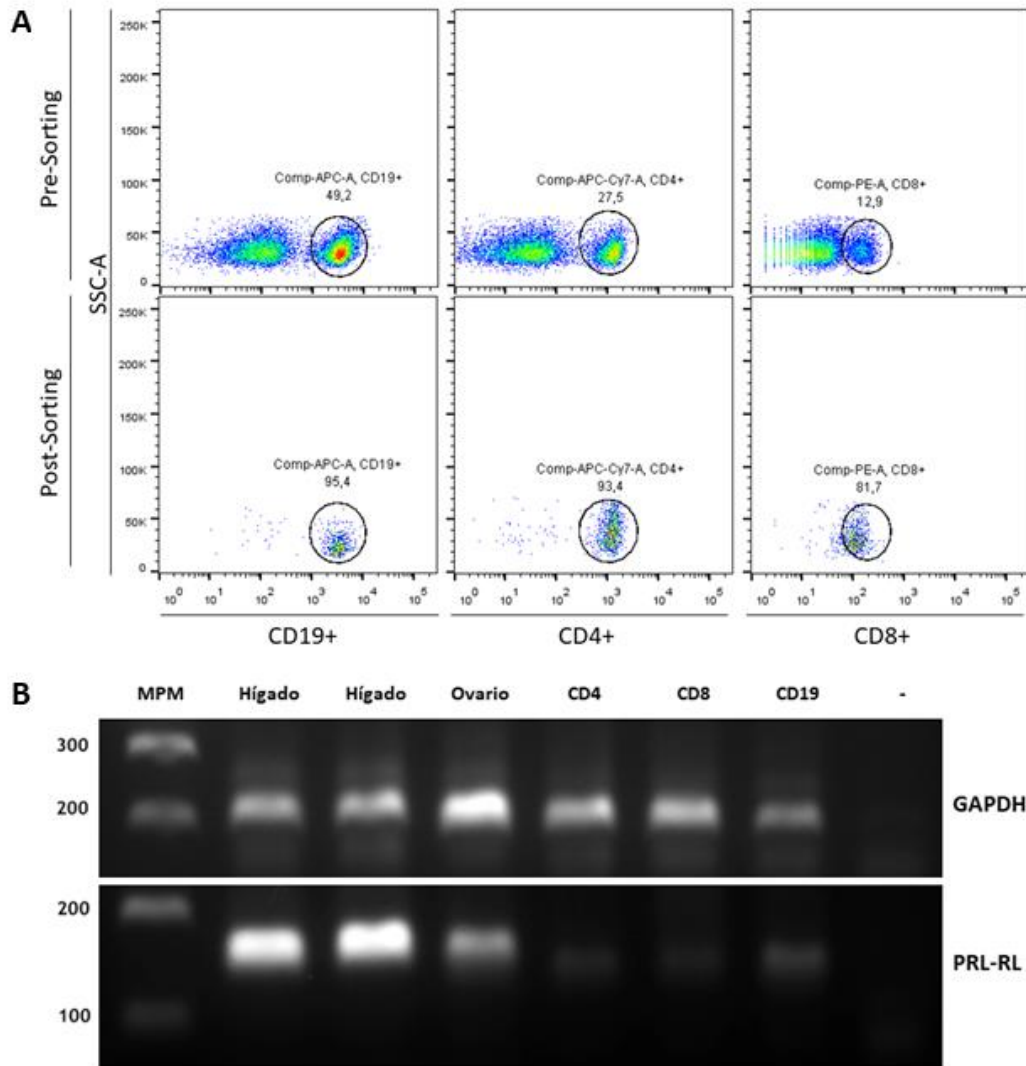


Figura 3. A. Pre- y post-Sorting de esplenocitos murinos marcados con Ac específicos para CD19, CD4 y CD8; **B.** Evaluación por PCR y posterior gel de agarosa de la expresión de ARNm de PRL-RL de muestras de hígado, ovario y LT CD4⁺, LT CD8⁺ y LB CD19⁺ purificados por FACS. Control de carga: GAPDH (Glicerilaldehído 3 fosfato deshidrogenasa); Marcador de peso molecular: MPM. Control negativo: -.

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que células totales de bazo de ratones normales expresan ARNm de las dos isoformas del PRL-R. Sin embargo, el análisis de la expresión de ARNm de las isoformas corta y larga del PRL-R en poblaciones de LT CD4⁺, LT CD8⁺ y LB purificadas por citometría de flujo reveló solo la expresión de la isoforma PRL-RL.

Objetivo 2: Expresión de ARNm/proteína de PRL-R en esplenocitos murinos luego de la activación e inhibición

Luego de haber identificado la expresión del PRL-R en LT y LB en estado basal, decidimos estudiar su expresión en procesos de activación e inhibición linfocitaria. Uno de los mecanismos para regular la sensibilidad a una hormona durante un proceso tisular dependiente de ella, es la modificación de la expresión de su receptor en las células que componen ese tejido (Clay et al., 2020). Por lo tanto, frente a un aumento de la expresión del receptor, habrá mayor cantidad de ligando unido y si éste es un receptor activador llevará consecuentemente a una mayor activación de las vías de señalamiento asociadas a él (Antonio Blanco, 2015). Cabe recordar que la modulación de los receptores de hormonas peptídicas está gobernada por múltiples mecanismos incluyendo expresión del receptor y sus moléculas adaptadoras a nivel epigenético y transcriptómico, disponibilidad de sitios tirosina fosforilables, y presencia de inhibidores y activadores de toda la cascada río abajo del PRL-R (Antonio Blanco, 2015).

Como se mencionó en el capítulo anterior, pudimos identificar la presencia de ARNm de PRL-RS en bazo ex vivo de ratones C57, pero esta expresión fue muy baja y próxima al límite inferior de detección, por lo que no fue posible cuantificarla por qPCR. Además, en las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo de tesis, no pudimos evidenciar la expresión de PRL-RS en poblaciones de LT y LB purificados, posiblemente por la misma razón. Por lo expuesto, en los siguientes experimentos nos enfocamos en la expresión de PRL-RL y llevamos a cabo experimentos en los cuales estimulamos a las células inmunes con Concanavalina A (ConA), un activador policlonal, o con Dexametasona (Dexa), un glucocorticoide inmunosupresor que regula negativamente la activación de linfocitos e induce apoptosis.

Estimulación de esplenocitos murinos con ConA y Dexa

Cuando los linfocitos se estimulan en cultivo mediante un activador policlonal como ConA, los mismos aumentan la expresión de marcadores tempranos de activación como las moléculas CD69 y CD25 (Receptor de IL2). Para corroborar la activación inducida tras 24 horas de estímulo con ConA, evaluamos por citometría de flujo la expresión de CD69 y CD25. Como se puede observar en la figura 4, el porcentaje de esplenocitos totales activados fue de aproximadamente un 8% en condiciones de cultivo sin estímulo, mientras

que aumentó a un 30% en esplenocitos murinos tratados con ConA. De forma similar, corroboramos la presencia de muerte celular en los cultivos de esplenocitos como medida del efecto de Dexa (datos no mostrados). Cabe destacar que Dexa puede ser utilizada como un agente supresor a bajas dosis o un inductor de apoptosis a dosis más altas (Direk et al., 2016; Giles et al., 2018).

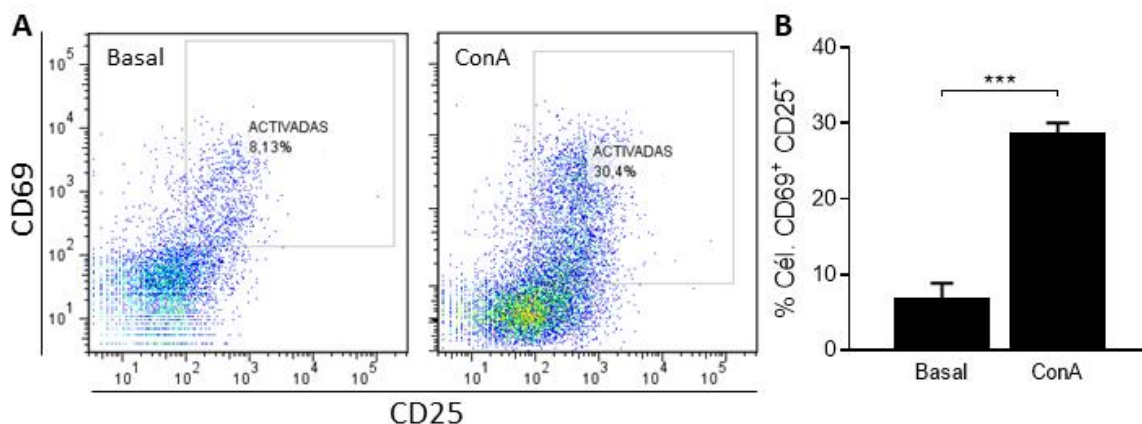


Figura 4. Activación de esplenocitos por ConA. **A** Dot plot representativo de la expresión de CD69 y CD25 de esplenocitos cultivados en estado basal y luego del estímulo de 24 horas con ConA; **B** Gráfico de barras correspondiente. $n = 6$ por grupo. Test estadístico T test, *** $p < 0,001$.

Expresión de ARNm de PRL-R en esplenocitos de ratones C57 en respuesta a la activación con ConA e inhibición con Dexa

Al analizar la expresión de PRL-R en esplenocitos murinos se observó una disminución significativa de la expresión de PRL-R luego de la activación con ConA ($p < 0,01$), mientras que frente a la supresión dada por Dexa, la expresión del PRL-RL incrementó significativamente ($p < 0,0001$) (figura 5). En forma independiente de los efectos reportados de PRL de promover la activación, proliferación y supervivencia linfocitaria (Chavez-Rueda et al., 2005; Legorreta-Haquet et al., 2013; Peeva et al., 2003; Takizawa et al., 2005; Xu et al., 2010), nuestros resultados indican que durante la supresión con Dexa los linfocitos aumentarían la sensibilidad a PRL, como consecuencia de la mayor expresión de ARNm de la isoforma larga de PRL-R. Como control de funcionamiento de ambos estímulos, cultivamos a los esplenocitos en forma simultánea con ConA más Dexa (C+D) durante 24 horas y luego evaluamos la expresión de PRL-RL. La estimulación simultánea suprimió los efectos de Dexa y condujo la expresión de PRL-RL a valores similares a los obtenidos luego de la estimulación con ConA (figura 5).

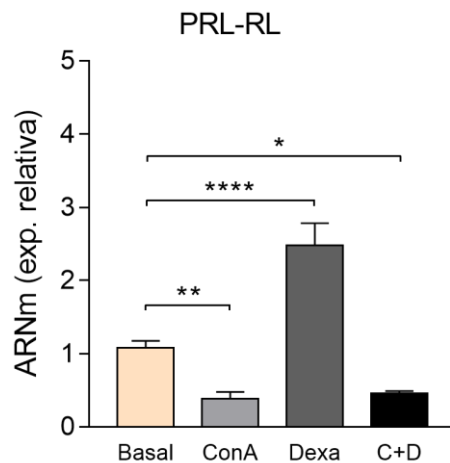


Figura 5. Expresión de ARNm de PRL-RL en esplenocitos murinos de ratones C57 en estado basal, estimulados con ConA, Dexa y ConA+Dexa. $n=6$ por grupo. Test estadístico ANOVA I vía post transformación logarítmica; post-hoc Fisher LSD $*p<0,05$; $**p<0,01$; $****p<0,0001$.

Expresión proteica de PRL-R en esplenocitos de ratones C57 en respuesta a la activación con Con A e inhibición con Dexa

Teniendo en cuenta que la regulación de la expresión del PRL-R puede darse en diferentes niveles incluyendo un control postranscripcional, nos propusimos evaluar la modulación de la expresión proteica de PRL-R de membrana en respuesta a ConA y Dexa mediante citometría de flujo. Para ello, esplenocitos murinos cultivados de forma similar a la antes descrita fueron marcados con anticuerpos específicos para las diferentes poblaciones celulares y para PRL-R. Cabe destacar que el anticuerpo utilizado para determinar la expresión de PRL-R no distingue entre las isoformas del receptor dado que reconoce el dominio extracelular del PRL-R, el cual es un dominio único compartido por las diferentes isoformas.

Encontramos que en ambas subpoblaciones de LT $CD4^+$ y $CD8^+$, la cantidad de células que expresaban el PRL-R fue muy baja en comparación con la expresión en LB (figura 6). Como se puede observar en la figura 6.A y 6.D, LT $CD3^+CD4^+$ no presentaron cambios en la expresión del PRL-R luego de la estimulación con ConA o Dexa. En LT $CD3^+CD8^+$ la expresión del PRL-R se ve aumentada ($p=0,0094$) cuando se estimula con Dexa en comparación con la expresión basal mientras que los otros estímulos no alteran la expresión del PRL-R (figura 6.B y 6.E). Finalmente, en LB $CD19^+$ podemos observar que mientras el estímulo con Dexa aumenta la expresión de PRL-R, el estímulo con ConA la disminuye; también podemos observar que el estímulo de ConA revirtió o suprimió los efectos de Dexa llevando los niveles a valores que no eran significativamente diferentes de los de ConA sola

(figura 6.C y 6.F). Estos resultados en LB se corresponden con los datos obtenidos al evaluar el ARNm de PRL-R en esplenocitos totales (figura 5).

La mayor expresión del PRL-R en LB en comparación con los LT sugiere que los LB podrían ser responsables de los cambios observados en los niveles de ARNm del PRL-RL proveniente del cultivo primario de esplenocitos. De forma similar a lo mencionado previamente para los esplenocitos, en este caso los LB podrían aumentar la sensibilidad a PRL durante una supresión inmune promoviendo procesos antiapoptóticos y de supervivencia celular principalmente a nivel de la inmunidad humoral. Por el contrario, durante la activación, los LB estarían limitando la respuesta a PRL. Estos datos sugieren que a pesar de que LT expresen PRL-RL, las células que dirigirían las respuestas a PRL de manera más eficiente debido a los cambios en la expresión de su receptor serían los LB.

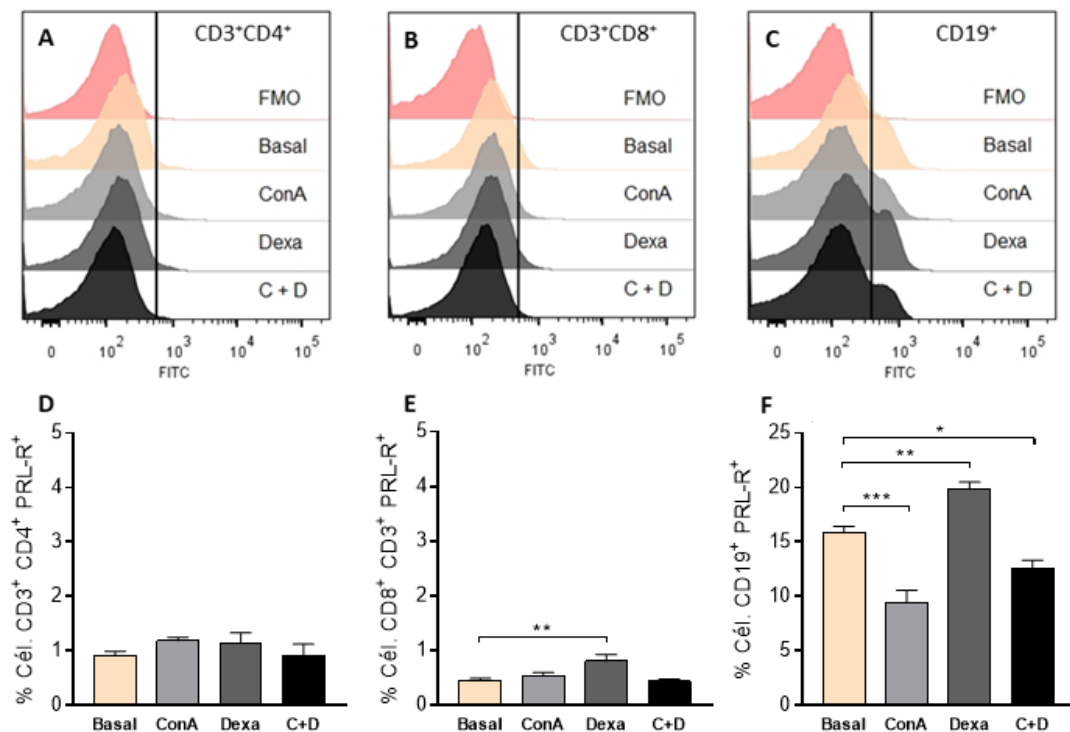


Figura 6. Histogramas representativos de esplenocitos **A** CD3⁺CD4⁺, **B** CD3⁺CD8⁺ y **C** CD19⁺ que expresan PRL-R en estado basal, estimulados con ConA, Dexa y ConA+Dexa. Gráficos de barra de esplenocitos **D** CD3⁺CD4⁺, **E** CD3⁺CD8⁺ y **F** CD19⁺ que expresan PRL-R. Test estadístico ANOVA de 1 vía, post-hoc Fisher LSD; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Expresión de PRL-R en LT reguladores en respuesta a la activación con ConA e inhibición con Dexa

Teniendo en cuenta que observamos un aumento en la expresión del PRL-R en linfocitos efectores bajo condiciones supresoras, nos preguntamos si LT con funciones antagónicas a

las células efectoras modulan la expresión del PRL-R de manera similar. Para responder esta pregunta evaluamos la contraparte supresora de la respuesta inmune, determinando la expresión del PRL-R en LT reguladores (LTreg). Como se puede observar en la figura 7, la expresión de PRL-R en LTreg $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ aumentó frente al agregado de Dexa. Mientras que cuando los LTreg se estimularon con ConA no hubo alteraciones en la expresión del receptor en estas células. Se sabe que mientras que en LT efectoras Dexa inhibe la proliferación, en LTreg induce la apoptosis (Pandolfi et al., 2013). De acuerdo con esto, nuestros resultados apoyarían nuestra hipótesis de que PRL-R aumenta para promover la sobrevivencia celular y rescatar a las células, en este caso a los LTreg, de la apoptosis. Sería interesante abordar en el futuro, el análisis de la expresión de PRL-R en LTreg luego de la estimulación clásica de LTreg con IL-2 y antiCD3/CD28.

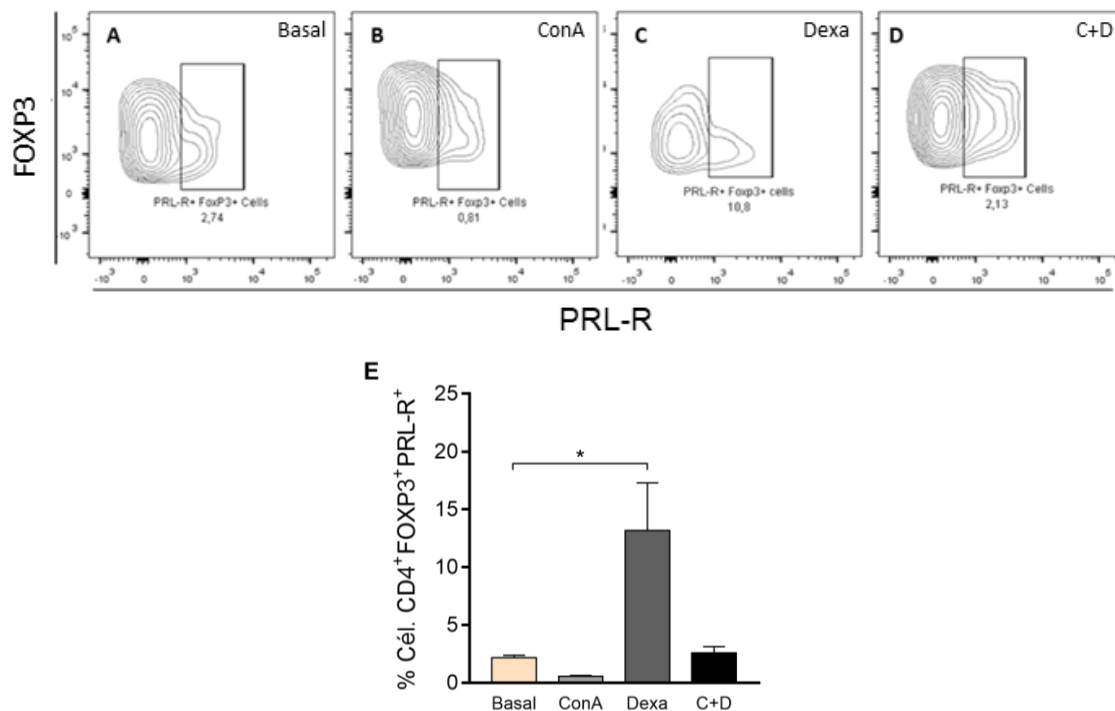


Figura 7. Contour plot representativo de LTreg $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ que expresan PRL-R en estado **A** Basal, estimulados con **B** ConA, **C** Dexa y **D** ConA+Dexa; **E** Gráfico de barras correspondiente. $n=6$ por grupo. Test estadístico Kruskal Wallis; * $p<0,05$.

Los resultados generales hasta aquí obtenidos demuestran que esplenocitos de ratones sanos modulan negativamente la expresión de PRL-R frente a estímulos activadores, mientras que aumentan la expresión frente a estímulos supresores como Dexa, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico. Además, LTreg también aumentan la expresión de PRL-R

en respuesta a Dexa, apoyando nuestra hipótesis de que PRL-R aumenta para promover la supervivencia celular y rescatar a las células de la apoptosis.

Además, la mayor expresión de PRL-R en LB y la semejanza del comportamiento de la expresión de ARNm del PRL-R en esplenocitos y de proteína en LB podría indicar que la respuesta a PRL está dirigida principalmente por LB.

Objetivo 3: Expresión de ARNm/proteína de PRL-R en esplenocitos de ratones con LES

Reportes previos han postulado una relación entre PRL y las patologías autoinmunes como LES, sin embargo, el rol de PRL-R en esta patología aún no ha sido esclarecido (Legorreta-Haquet et al., 2013; Rezaieyazdi and Hesamifard, 2006; Venkatesh et al., 2006). Para analizar si PRL-R está involucrado en el desarrollo del LES realizamos un abordaje similar al del objetivo 2 utilizando en este caso esplenocitos provenientes de ratones susceptibles a desarrollar una patología similar al LES. Teniendo en cuenta que el lupus humano es una patología extremadamente heterogénea nos propusimos utilizar tres cepas de ratones propensos a generar una patología lúpica en las que se han propuesto diferentes mecanismos patogénicos. En primer lugar, se eligieron animales RIIb cuyo mecanismo patogénico se basa en la pérdida de tolerancia periférica de LB por la ausencia del receptor $Fc\gamma RIIb$ de IgG de baja afinidad asociado al dominio ITIM inhibitorio (Verbeek et al., 2019). Este receptor es utilizado para autorregular la producción de anticuerpos mediante la detección de complejos inmunes circulantes (Abul K. Abbas, 2012). Al no tener este receptor inhibitorio, los LB activados continúan produciendo inmunoglobulinas por lo que la enfermedad en estos ratones se asocia principalmente a una desregulación de la respuesta humoral. En segundo lugar, utilizamos ratones NZM cuya patogénesis autoinmune se basa en portar tres alelos lúpicos, Sle1.Sle2.Sle3 con una alta penetrancia fenotípica. El locus Sle1 se asocia a diferentes procesos incluyendo la regulación de LT $CD4^+$ y LB (Chang et al., 2014), y la asociación entre el receptor de estrógeno y la activación linfocitaria (Yoachim et al., 2015). Al igual que los animales RIIb, este modelo murino de lupus está asociado a alteraciones en la tolerancia periférica, pero en este caso están involucradas tanto la respuesta celular como la humoral (Chang et al., 2014). En tercer lugar estudiamos ratones FAS, los cuales han sido utilizados ampliamente en el estudio de enfermedades autoinmunes sistémicas ya que poseen el gen Fas mutado espontáneamente y debido a ello presentan una falla en los mecanismos de tolerancia central principalmente de linfocitos LT $CD4^+$ y LB (Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

Análisis de parámetros clínicos e inmunológicos de Animales propensos a LES

Para corroborar que las cepas de ratones RIIb, NZM y FAS en nuestras condiciones experimentales efectivamente desarrollaban la enfermedad, se analizaron distintos

parámetros asociados a LES. Las mediciones de proteinuria (figura 8.A.), índice esplénico (figura 8.B.) y anticuerpos anti ADN (figura 8.C.) evidenciaron un aumento de cada una de ellas en las cepas de ratones lúpicos en relación al grupo control. Con distintos valores de estos parámetros en cada cepa particular, los resultados confirman que los animales utilizados de las cepas RIIB, NZM y FAS desarrollaron una patología autoinmune similar al LES en humanos.

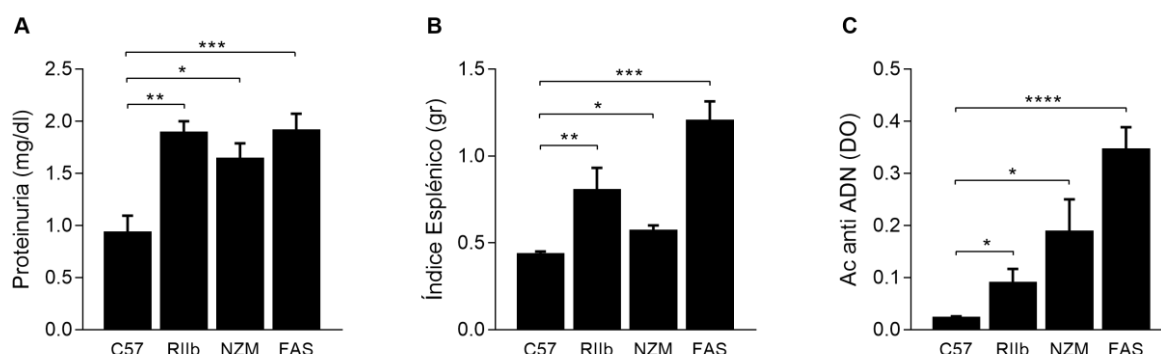


Figura 8. Medición de parámetros marcadores de LES. **A.** Medición de proteinuria; **B.** Cálculo de índice esplénico y **C.** Cuantificación de anticuerpos anti ADN por medición de densidad óptica (DO). Test estadísticos, ANOVA I vía, post-hoc Fisher LSD (panel A) o Kruskal Wallis (paneles B y C); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Expresión ex vivo de PRL-R en esplenocitos de ratones lúpicos

Con los antecedentes sobre la heterogeneidad del LES y utilizando los diferentes modelos murinos nos propusimos evaluar si a nivel ex vivo, PRL-R se expresa de forma diferencial en las tres cepas lúpicas en comparación con la cepa control. Como se puede observar en la figura 9, existe un aumento de la expresión de PRL-R en las cepas RIIB ($p < 0,0001$) y FAS ($p < 0,05$) respecto de la cepa control. Estos resultados pueden sugerir que frente a la deficiencia de moléculas cruciales en la regulación negativa de la activación linfocitaria como son los receptores $Fc\gamma RIIB$ y Fas, la expresión de PRL-R podría verse desregulada, induciendo así a alteraciones en la sensibilidad a PRL por parte de los esplenocitos.

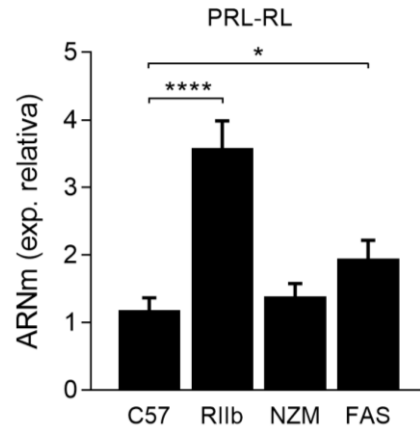


Figura 9. Gráfico de barras correspondiente a la expresión *ex vivo* de ARNm de PRL-RL en esplenocitos totales de ratones C57, RIIb, NZM y FAS. $n=6$ por grupo. Test estadístico ANOVA I vía, post-hoc Fisher LSD; post transformación logarítmica; * $p<0,05$; **** $p<0,0001$.

Modulación de los niveles de ARNm de PRL-RL en respuesta a la activación e inhibición linfocitaria

Ya que los mecanismos responsables del fenotipo lúpico de los modelos murinos RIIb y FAS están asociados directa o indirectamente a una desregulación de procesos de activación y supresión, analizamos si la modulación del PRL-RL se ve afectada en estas situaciones. Como se puede observar en la figura 10, esplenocitos provenientes de animales lúpicos manifiestan incrementados los niveles de ARNm del PRL-R en respuesta a Dexa como lo observado en la cepa control. Estos datos sugieren que esplenocitos de las cepas RIIb y FAS, no logran modular la expresión del receptor en respuesta a Dexa como lo hace la cepa control, y solo la cepa RIIb responde a ConA como lo hace la cepa control. Esto indicaría que la presencia de alteraciones fenotípicas condiciona la modulación del PRL-RL. Cuando analizamos la expresión de PRL-RL en esplenocitos de la cepa NZM, observamos que, si bien tiende a comportarse como el grupo control en respuesta a los diferentes estímulos, los resultados no son estadísticamente significativos, por lo que podríamos suponer que la presencia de alelos lúpicos también condiciona a la expresión de PRL-RL en individuos con LES, pero de manera menos marcada que en las cepas RIIb y FAS.

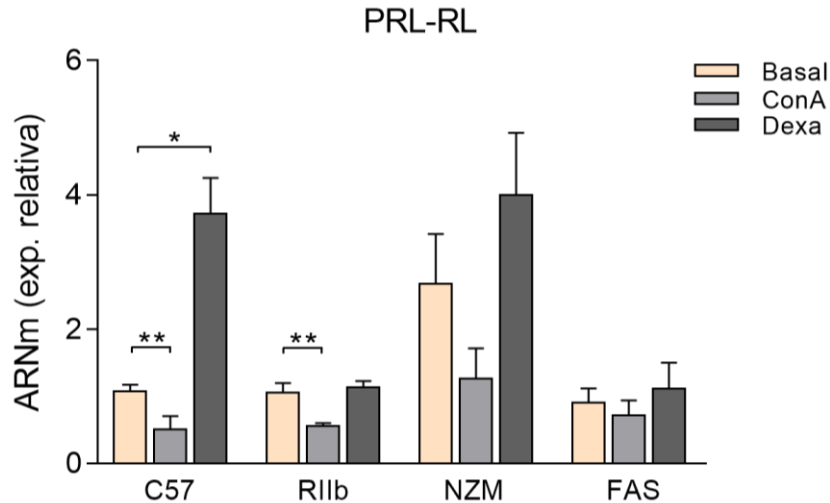


Figura 10. Gráfico de barras correspondiente a la expresión de ARNm de PRL-RL en esplenocitos totales de ratones de la cepa C57, RIIb, NZM y FAS en estado basal y estimulados con ConA o Dexa. $n=6$ por grupo. Test estadístico ANOVA de una vía para todas las cepas; post-hoc Fisher LSD. Transformación logarítmica para la cepa C57; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Modulación de la expresión de PRL-R en LB CD19⁺ en estado basal y en respuesta a la activación e inhibición

Teniendo en cuenta que la expresión del PRL-R en LT es muy baja, nos enfocamos en LB que tienen una expresión al menos 5 veces superior. Como se puede observar en las figuras 6.F y 11, cuando evaluamos la expresión de PRL-R en LB provenientes de animales C57 observamos un aumento de esta en respuesta a Dexa y una disminución en respuesta a ConA. Sin embargo, en la figura 11 podemos observar que LB de las cepas RIIb, NZM y FAS no evidenciaron cambios en la expresión de PRL-R en respuesta a Dexa a diferencia de lo observado en la cepa control, y solo la cepa RIIb presentó una disminución de la expresión de PRL-R luego de la estimulación con ConA. Por otro lado, LB de la cepa de ratones FAS presentó un comportamiento similar a la cepa control, evidenciando un aumento en la expresión de PRL-R en respuesta a Dexa y una leve disminución frente a la activación con ConA (figura 11). La ausencia de cambios en la expresión de PRL-R en respuesta a Dexa por parte de los ratones RIIb pueden deberse a que la carencia del receptor $Fc\gamma RIIb$ en estos LB altere la expresión de PRL-R como parte de una desregulación celular que desencadena la patología autoinmune. La ausencia de cambios significativos en la expresión de PRL-R en LB de NZM podría deberse a la presencia del locus *Sle1*. Estos resultados podrían asociarse a reportes donde se observa que el locus *Sle1* impacta en la biología de LB, en procesos de activación y regulación celular (Chang et al., 2014; Yoachim et al., 2015).

Por el contrario, a pesar de la ausencia de Fas sobre los LB, éstos fueron capaces de responder a Dexa con un aumento en la expresión de PRL-R y a ConA con una disminución de este. Esto indicaría que la ausencia de Fas en estas células no altera la regulación a través de PRL-R inducida por los estímulos empleadas de ConA y Dexa.

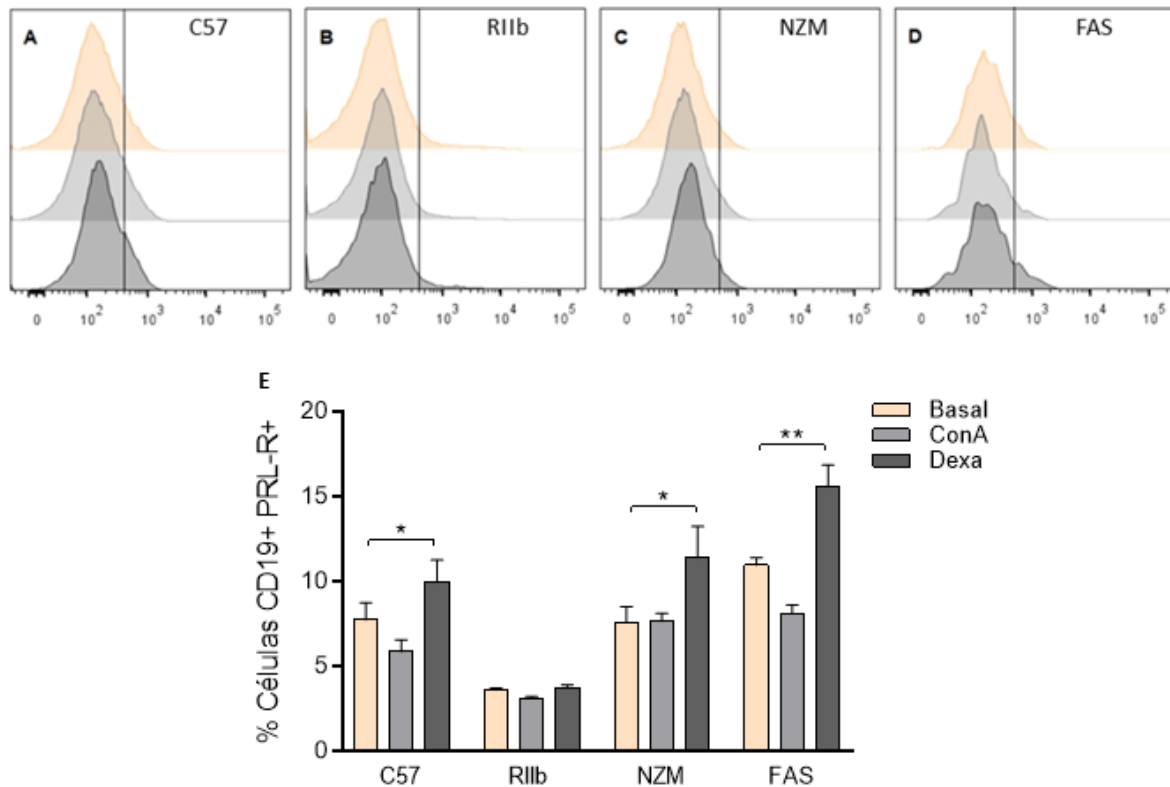


Figura 11. Histograma representativo de LB CD19⁺ que expresan PRL-R en las cepas de ratones **A** C57, **B** RIIB, **C** NZM y **D** FAS; **E** Gráfico de barras correspondiente a las medias de los porcentajes de LB que expresan PRL-R. Test estadístico ANOVA I vía, post-hoc Fisher LSD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Expresión de PRL-R en timocitos de ratones C57 y FAS

Teniendo en cuenta que los animales FAS presentan alteraciones de la tolerancia central tímica (Kishimoto and Sprent, 2000), junto con el hecho de que PRL se expresa en timo, nos preguntamos si los timocitos presentaban una expresión alterada de PRL-R durante la ontogenia linfocitaria T y si esta se ve afectada durante una selección negativa defectuosa. Como podemos observar en la figura 12, no se encuentran diferencias en la expresión de PRL-R en timocitos de ratones C57 y FAS. Este resultado sugiere que durante una selección negativa tímica defectuosa la sensibilidad a PRL permanecería normal. Probablemente los cambios en la expresión del PRL-R a nivel de LT estén asociados a

procesos posteriores a la ontogenia linfocitaria fuera del timo o como consecuencia de la aparición de la enfermedad.

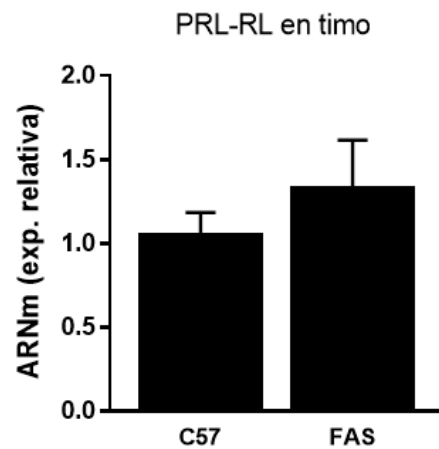


Figura 12. Expresión de ARNm de PRL-RL en timocitos murinos de la cepa C57 y FAS. $n=6$ por grupo. Test estadístico t test.

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que esplenocitos de ratones lúpicos de las cepas RIIb y FAS expresan mayores niveles de ARNm para PRL-RL a nivel *ex vivo*.

En la cepa FAS los cambios en la expresión del PRL-RL luego de la estimulación con Dexa fueron similares a los del grupo control, mientras que esplenocitos de las cepas RIIb y NZM no mostraron diferencias en la expresión de PRL-R luego de la estimulación. En respuesta a la estimulación con ConA, esplenocitos de las cepas RIIb y FAS respondieron de manera similar al grupo control, mientras que esplenocitos de la cepa NZM no mostraron alteraciones en la expresión de PRL-R luego de la estimulación.

Objetivo 4: Expresión génica y de ARNm del PRL-R en individuos sanos y pacientes con LES

Expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas

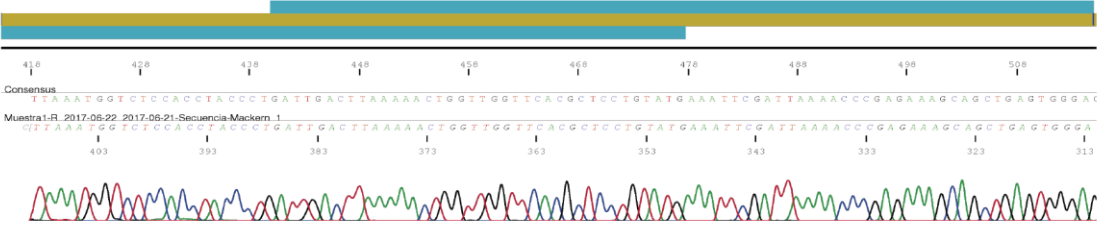
Teniendo en cuenta la mayor expresión del PRL-R observada en los diferentes modelos murinos lúpicos utilizados, nos propusimos evaluar la expresión de PRL-R en individuos sanos y en pacientes con LES. Para ello, analizamos la expresión de ARNm de las isoformas larga y corta (PRL-R1b) del receptor en PBMC de individuos saludables y pacientes con LES.

Validación de los productos de qPCR de las isoformas de PRL-R

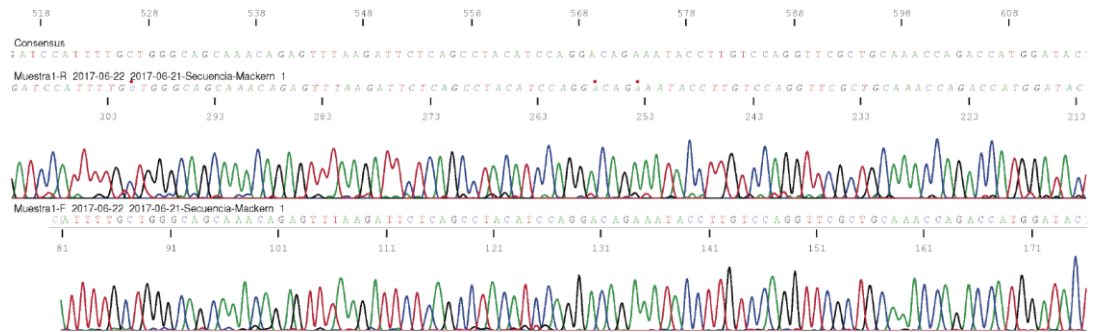
La validación de la identidad del producto de amplificación de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas, se realizó mediante secuenciación por el método de Sanger y posterior análisis en BLAST. Se obtuvo un alineamiento del 99% con las secuencias de referencia tanto para PRL-RL (figura 13.A.) como para PRL-R1b (figura 13.B.). Los resultados de alineación con las secuencias de referencia se presentaron a través del *software* SeqScape. En la figura 13 podemos observar que la barra mostaza representa a la secuencia de referencia de PRL-R y las barras celestes son cada una de las secuencias forward y reverse obtenidas en la reacción de Sanger. Debajo de las barras se presenta toda la secuencia de los fragmentos analizados. Cada pico representa la base nucleotídica que se ubica en cada posición y los distintos colores de los picos identifican las distintas bases nitrogenadas. Las secuencias de las muestras analizadas tuvieron un alineamiento del 99% con las secuencias consenso de ambas isoformas de PRL-R, indicando la homología completa en ambos casos.

A. Isoforma PRL-RL

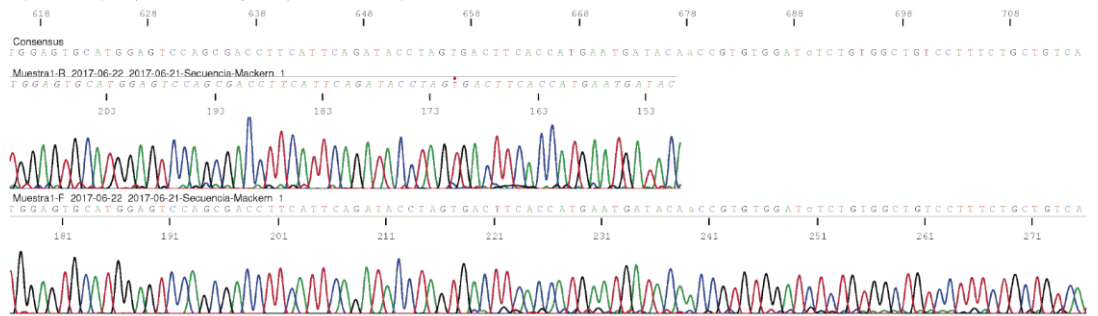
Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra1 Segment: Copied Reference Assembly



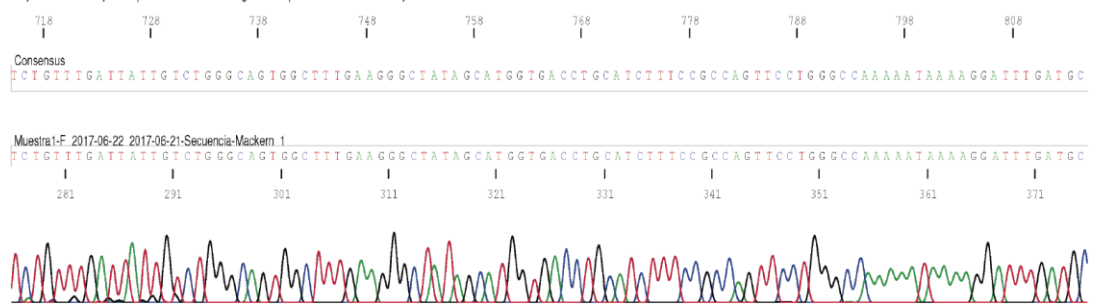
Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra1 Segment: Copied Reference Assembly



Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra1 Segment: Copied Reference Assembly

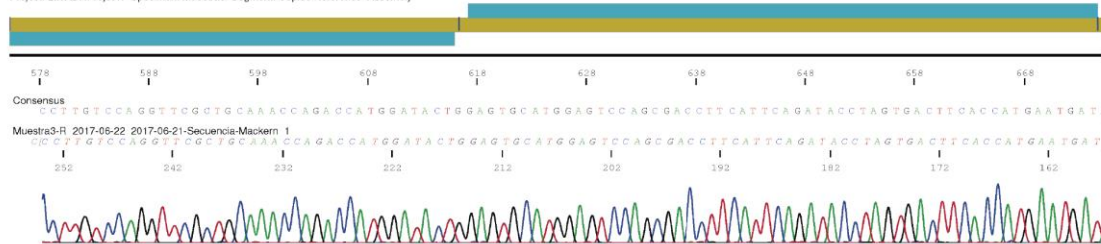


Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra1 Segment: Copied Reference Assembly

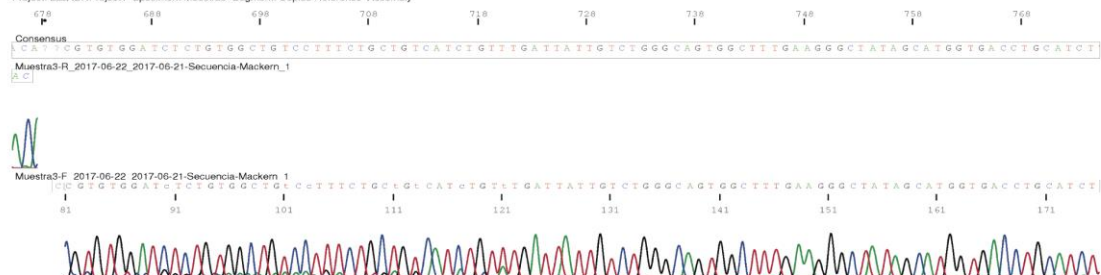


B. Isoforma PRL-R1b

Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra3 Segment: Copied Reference Assembly



Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra3 Segment: Copied Reference Assembly



Project: LabADNProject1 Specimen: Muestra3 Segment: Copied Reference Assembly



Figura 13. Validación de productos de PCR de PRL-RL y PRL-R1b a través del método de Sanger. Las secuencias fueron analizadas en BLAST obteniendo un 99% de homología con el gen del PRL-R. Los resultados se presentaron a través del software SeqScape.

Comparación de la expresión de las isoformas PRL-RL y PRL-R1b en PBMC humanas de individuos sanos y pacientes con LES

Para desarrollar el estudio traslacional con muestras de pacientes lúpicos iniciamos una colaboración científica con médicos reumatólogos del Hospital Central de Mendoza, Argentina, los cuales reclutaron 9 pacientes con LES y 5 individuos sanos (grupo control). En la Tabla 3 se observan las características clínicas de los pacientes, como la edad de comienzo de LES, la duración de la enfermedad, los valores de proteinuria, la presencia de anticuerpos anti ADN y el Índice de Actividad del Lupus Eritematoso Sistémico (SLEDAI). Este último se evalúa a través de una combinación de datos en la historia clínica, el examen

físico, pruebas funcionales de órganos específicos, y los estudios serológicos de los pacientes. El análisis incluye la evaluación de manifestaciones clínicas (poliadenopatias, artritis, alopecis, etc), pruebas de laboratorio (síndrome nefrótico, proteinuria, leucopenia, anticuerpos anti DNA, anti RO/LA, etc), remisiones de la enfermedad durante el último año, y otras complicaciones como infecciones, Diabetes Mellitus, entre otras.

Tabla 3. Características clínicas de pacientes femeninos con LES procedentes del Hospital Central de Mendoza, Argentina.

Pacientes con LES	Edad de comienzo de LES	Duración de LES (años)	Demora diagnóstica (meses)	N° de Brotes	Tipo de Brote	SLEDAI	Proteinuria	Ac anti ADN
1	23	11	36	2	Leves	0	No	Si
2	22	4	12	5	Moderados	5	Si	Si
3	31	3	4	5	Moderados	8	Si	Si
4	20	2	12	0	-	0	Si	Si
5	25	5	36	1	Leve	0	No	No
6	33	1	2	1	Leve	0	No	Si
7	40	3	9	0	-	0	No	No
8	16	14	12	0	-	0	No	No
9	23	10	24	0	-	5	No	Si

Como se muestra en la figura 14, determinamos por PCR la expresión de ambas isoformas del PRL-R. No se encontraron cambios significativos en la expresión de ARNm de las isoformas PRL-RL o PRL-R1b en pacientes con LES en relación a los individuos sanos, ni en la relación PRL-RL/PRL-R1b. Sin embargo, se observó que pacientes con LES mostraron una muy leve tendencia al aumento de los valores en la expresión del PRL-RL (figura 14.B.), a la disminución del PRL-R1b (figura 14.C.) y una relación PRL-RL/PRL-R1b aumentada en comparación al grupo control (figura 14.D). Teniendo en cuenta que el PRL-RL es el único capaz de señalar, estos datos sugieren que células del sistema inmune de pacientes con LES podrían presentar mayor sensibilidad a PRL que individuos saludables promoviendo así un estado de sobrevida celular. Esta sobrevida celular en pacientes con LES podría conducir a una perpetuación de la enfermedad.

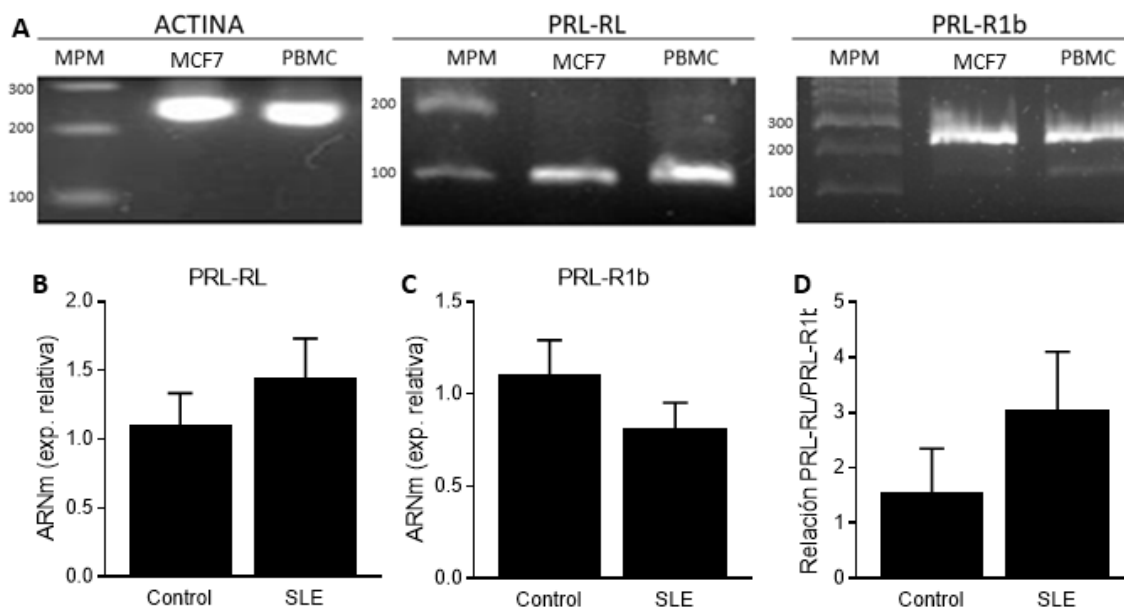


Figura 14. **A** Productos de PCR de los genes ACTINA, PRL-RL y PRL-R1b en PMBC de individuos sanos. MPM= marcador de peso molecular. MCF7= línea celular de cáncer de mama (control positivo), PBMC= muestra de PMBC de un individuo sano; **B** Expresión de ARNm de PRL-RL y **C** PRL-R1b, y **D** relación de la expresión de ambas isoformas de PRL-R en PMBC de individuos sanos y pacientes con LES ($p < 0,1902$). Análisis estadístico t test.

Correlaciones entre la expresión de las isoformas de PRL-R y parámetros clínicos como el SLEDAI y la duración de la enfermedad

Reportes indican que pacientes con LES presentan una correlación entre PRL y el SLEDAI (Wan Asyraf et al., 2018). Sin embargo, el estudio de una asociación entre la expresión de ARNm del PRL-R y SLEDAI no ha sido abordado previamente. Para determinar si los datos obtenidos de la expresión de PRL-R en PBMC guardan relación con algunos parámetros clínicos importantes como el SLEDAI y la duración de la enfermedad en pacientes con LES, realizamos un análisis de correlación de Pearson. Como podemos observar en la figura 15.A, B y C, no existe correlación entre la expresión de PRL-RL, PRL-R1b y la razón PRL-RL/1b con el SLEDAI ($p=0,497$; $p=0,975$; $p=0,381$; respectivamente), indicando que no hay asociación entre la expresión de las isoformas de PRL-R y la actividad de la enfermedad. Cuando se analizó la correlación entre la expresión de las isoformas de PRL-R y la duración de la enfermedad se observó que a medida que progresa la enfermedad disminuye moderadamente la expresión de PRL-RL (figura 15.D) y aumenta moderadamente la expresión de PRL-R1b (figura 15.E). Finalmente, se observó una correlación negativa de la duración de la enfermedad con la relación PRL-RL/PRL-R1b en pacientes con LES (figura 15.F). La correlación entre la relación PRL-RL/PRL-R1b y la duración de la enfermedad

tiene un comportamiento similar al observado en la correlación entre PRL-RL y la duración de la enfermedad, lo que indicaría la predominancia de la isoforma larga de PRL-R en PBMC. Los cambios de expresión de ambas isoformas del receptor podrían verse relacionados con el tratamiento para LES utilizado en nuestra cohorte de pacientes, o bien podrían indicar que la regulación de la respuesta inmune dada por PRL/PRL-R varía de acuerdo con etapas iniciales o cronicidad de la enfermedad.

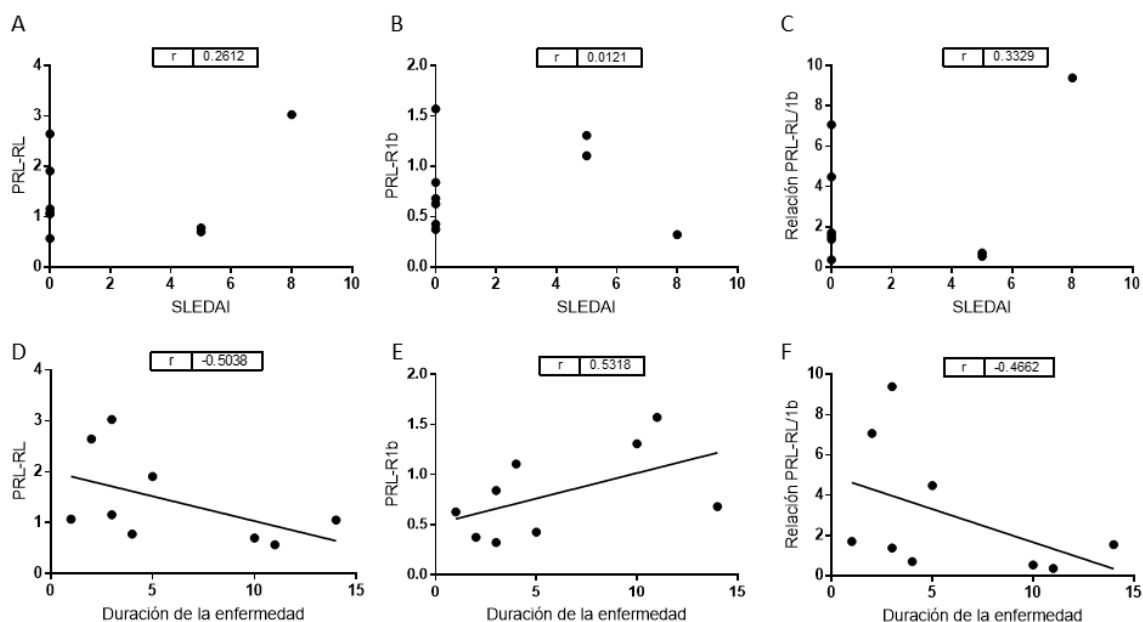


Figura 15. Correlaciones entre la expresión de ARNm de PRL-RL con el **A** SLEDAI y la **D** duración de la enfermedad; correlaciones entre la expresión de ARNm de PRL-R1b con el **B** SLEDAI y la **E** duración de la enfermedad; correlaciones entre la expresión de la relación PRL-RL/PRL-R1b con el **C** SLEDAI y la **F** duración de la enfermedad en pacientes lúpicos. Análisis de Correlación de Pearson.

Análisis de expresión génica de individuos sanos y pacientes con LES

Para ampliar nuestro conocimiento sobre la expresión de PRL-R en medicina humana, realizamos un análisis bioinformático de expresión génica. El set de datos utilizado está conformado por 20 muestras de individuos sanos y 292 muestras de pacientes con LES. Sobre la matriz de expresión génica disponible obtenida por *microarray* se analizaron 85 genes que incluyen los genes de PRL-R y PRL, receptores hormonales, genes asociados a LES, citoquinas, factores de transcripción, genes asociados a la proliferación, y genes que participan en distintas vías de señalización (Tabla 2).

En primera instancia nos propusimos observar si existían diferencias génicas entre los individuos sanos y los pacientes con LES, para permitir así identificar probables funciones

relevantes dentro la condición saludable o la patología lúpica, y relacionarlas con la expresión de PRL-R. Para abordar esta pregunta realizamos un análisis de clústeres para agrupar genes según su expresión de ADN en las diferentes muestras de individuos saludables y pacientes con LES. Una vez obtenida la matriz de expresión, la filas y columnas fueron ordenadas en base a un análisis de agrupamiento jerárquico, y se utilizó a los coeficientes de correlación de Pearson como métrica para medir las distancias. La figura 16 muestra un análisis de heatmap en donde se visualiza la agrupación de genes (filas) e individuos (columnas) según el nivel de expresión de los genes seleccionados para el análisis. La escala de colores Verde-Negro-Roja se utilizó para representar bajos, medios y altos niveles de expresión génica, respectivamente. Lo que podemos observar es que, a nivel genómico, a pesar de que se formen pequeños *clusters*, los individuos sanos se entremezclan con los pacientes lúpicos. Si bien necesitaríamos aumentar en número de individuos sanos analizados, este análisis nos indica que la expresión génica de individuos sanos no se diferencia completamente de la observada en pacientes con LES, al menos en cuanto a los genes de interés analizados en nuestro estudio.

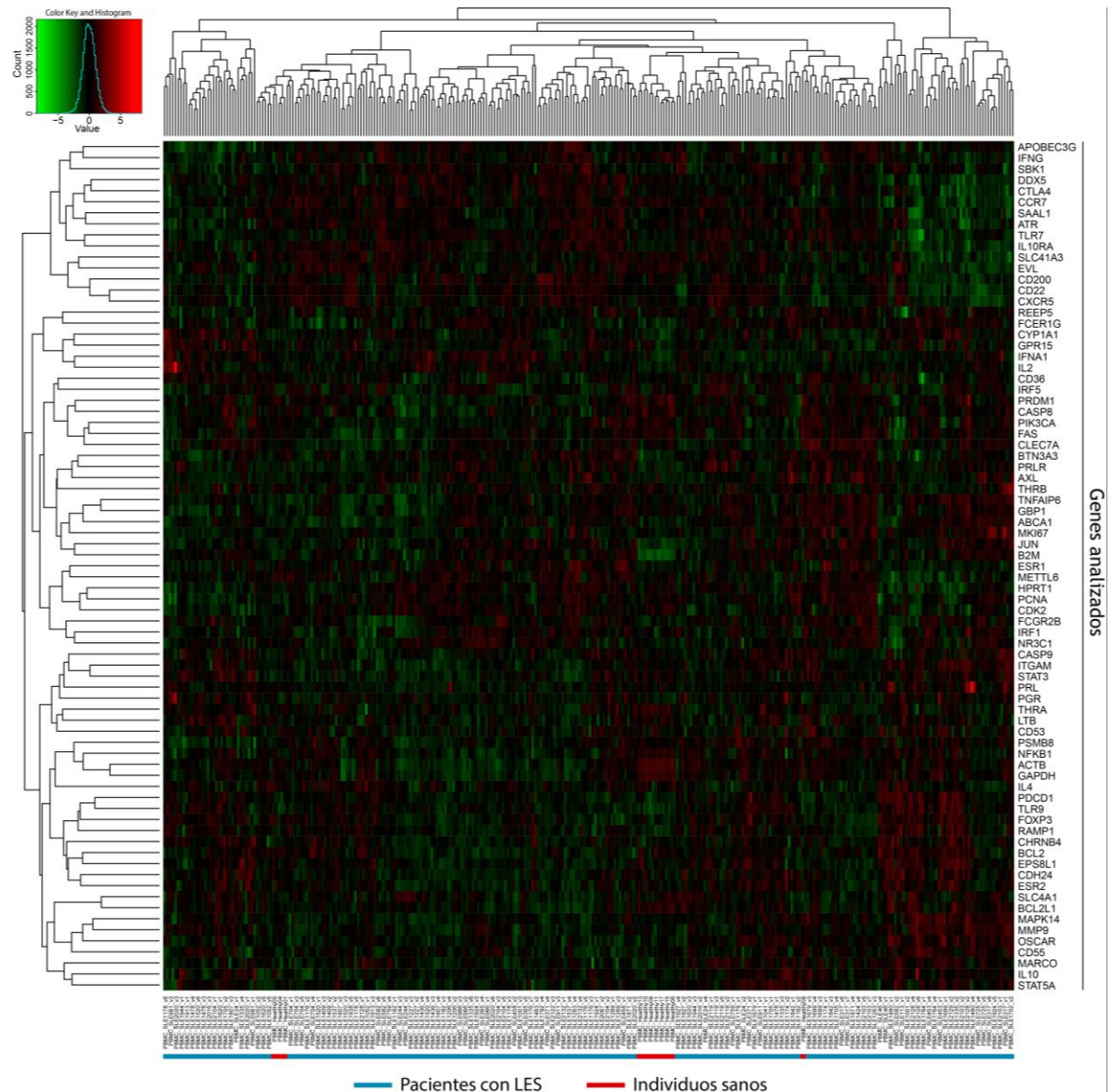


Figura 16. Análisis de Heatmap de genes relacionados a LES, PRL y PRL-R en individuos sanos y pacientes con LES. Las franjas de color rojo (individuos sanos) y azul (pacientes con LES) indican la ubicación de acuerdo al agrupamiento jerárquico de cada individuo dentro del heatmap.

Análisis de expresión génica de pacientes con LES

Teniendo en cuenta la naturaleza heterogénea del lupus y los datos obtenidos en la presente tesis tanto en muestras murinas como humanas de individuos con LES, nos preguntamos si la expresión de PRL-R se asocia a algún determinado perfil génico ligado a activación celular, proliferación, apoptosis o interferones ("IFN- α signature").

Para estudiar el comportamiento de PRL-R en la población con LES se desvinculó a la población control (individuos sanos) del análisis. Como podemos observar en el dendrograma superior de la figura 17, los pacientes lúpicos se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a los niveles de expresión de los genes analizados (entendiendo esta división como la primera ramificación del dendrograma en sentido del avance del mismo). A estos grupos los llamamos Grupo LES I y Grupo LES II. Encontramos que las diferencias de expresión de ambos grupos se debían a que genes que se sobreexpresaban o subexpresaban en LES I, se comportaban de manera inversa en LES II en la mayoría de los pacientes pertenecientes al grupo, aunque esto no fue totalmente homogéneo. Sin embargo, la expresión de algunos genes como PRLR no mostró diferencias de expresión en los dos clusters encontrados.

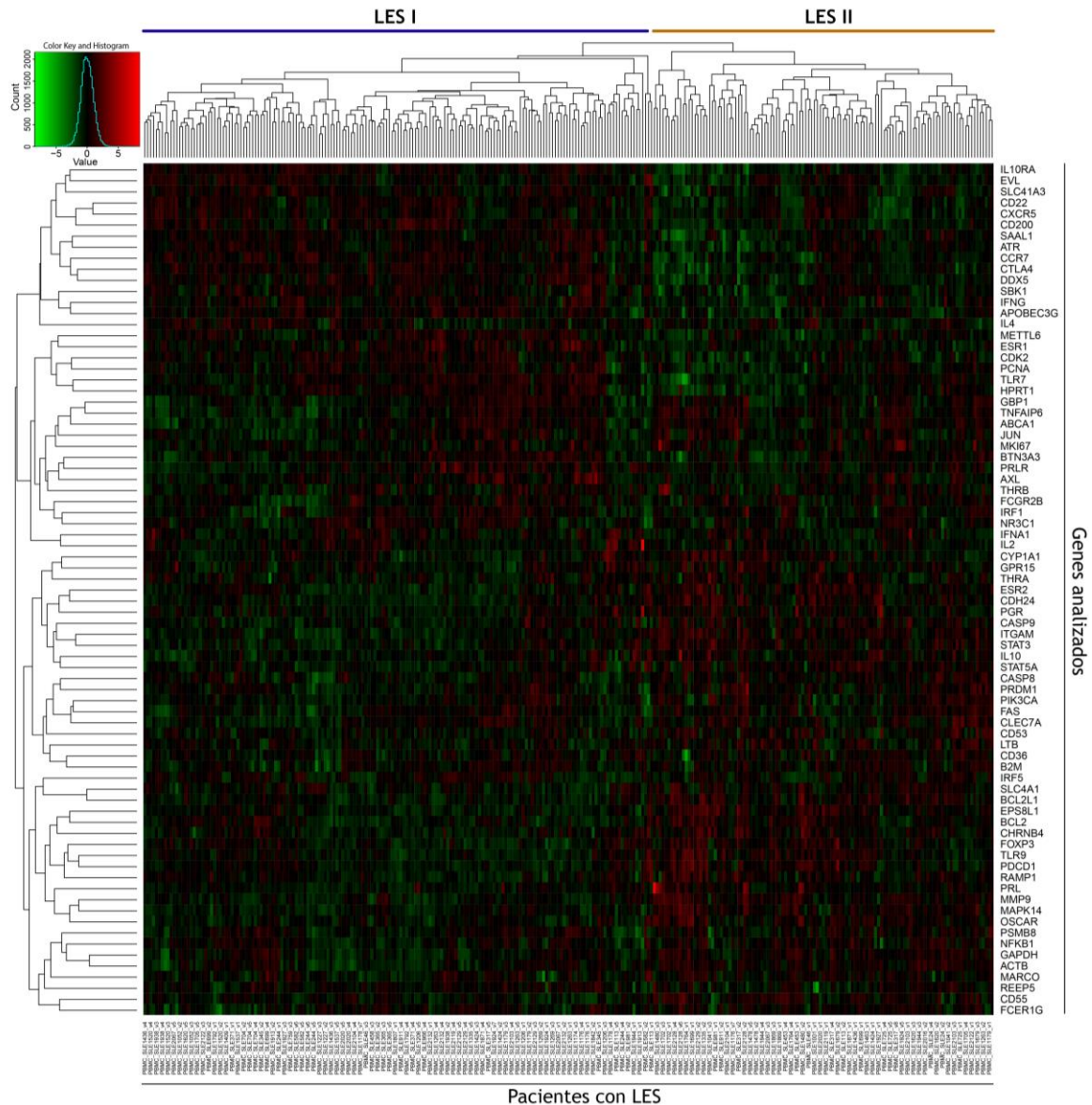


Figura 17. Análisis de Heatmap de genes relacionados a LES, PRL y PRL-R en pacientes con LES. La franja de color azul y naranja engloban pacientes LES con similitud en su expresión.

Expresión de PRL y PRL-R en LES I y LES II en relación al grupo control

Como pudimos observar en la figura 17, los pacientes con LES se dividen en dos grandes grupos con relación a la expresión génica de los genes analizados. Sin embargo, la expresión de PRL-R no parecería variar en consecuencia a esto. Para visualizar si PRL y PRL-R se expresan de manera diferencial en cada uno de los grupos LES en relación a los individuos sanos dividimos a los 292 pacientes con LES en dos grupos teniendo en cuenta el análisis de clusters realizado. El perfil de expresión de 20.742 genes de ambos grupos de pacientes con LES fue comparado con el grupo de pacientes sanos por lo que la expresión

de cada gen es un valor relativo a su expresión en individuos sanos. De forma similar a lo encontrado en nuestra cohorte de pacientes con LES, tanto el grupo LES I como el grupo LES II presentan un leve aumento en la expresión génica de PRL-R en relación al grupo control con un valor p ajustado (FDR, del inglés *False Discovery Rate*) de 0,0011 y 0,0059, respectivamente (figura 18). Podemos observar que la expresión del gen de PRL no se ve alterada en los grupos LES en relación a los individuos control. Estos datos nos muestran que hay un leve incremento de la expresión de PRL-R en pacientes lúpicos en relación a los individuos sanos, lo que está en consonancia con la relación que observamos entre PRL-RL/1b de nuestros pacientes.

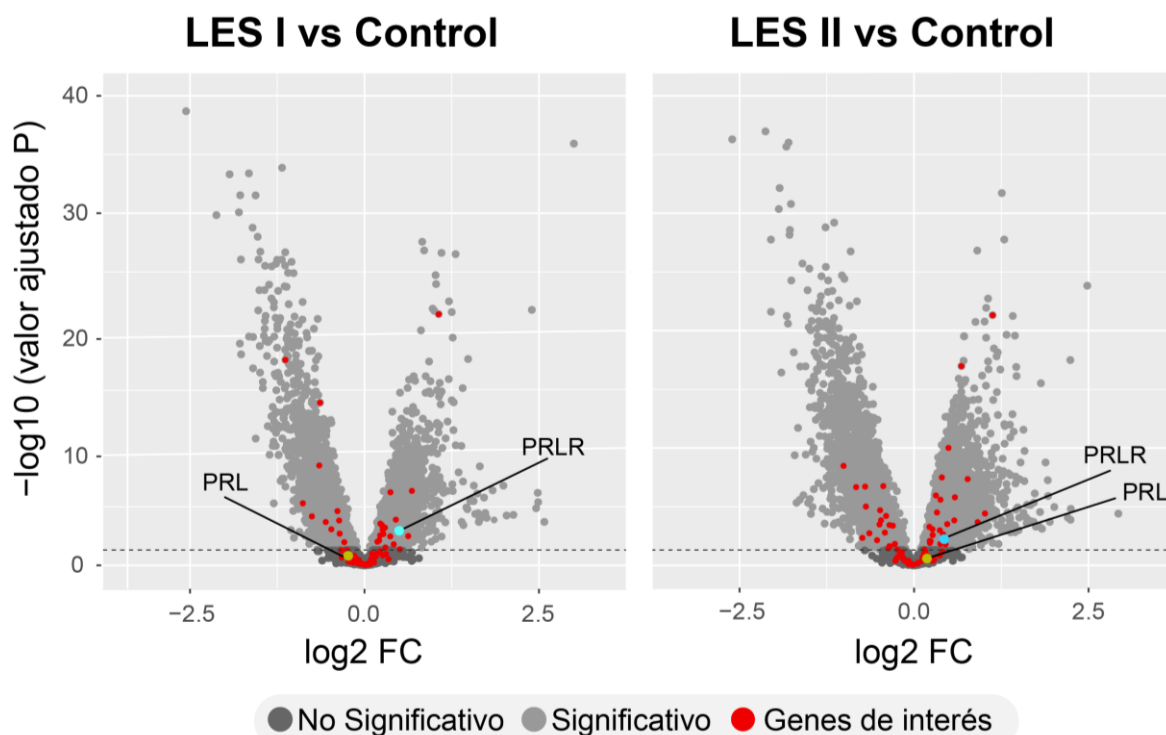


Figura 18. Expresión génica de PRL y PRL-R (azul) de **A** pacientes del grupo LES I y **B** pacientes del grupo LES II en relación a los individuos sanos (control).

Diferencias de expresión génica entre los grupos de pacientes LES I y LES II

Para profundizar en el análisis de las diferencias encontradas entre los grupos LES I y LES II realizamos un diagrama de Venn indicando los genes sobre y subexpresados en ambos grupos. Como podemos observar en la figura 19, ambos grupos comparten genes sobreexpresados como PRLR, TLR9, IL2 e IFNA1 y subexpresados como FAS, CAS8, PIK3CA, entre otros. Sin embargo, hay otro grupo de genes que parecen ser exclusivos de cada grupo LES. En el caso de LES I, hay genes involucrados en procesos antiapoptóticos como BCL2 y BCL2L1 y STAT3 que se encuentran subexpresados mientras que otros

genes como IL10Ra y TLR7 se encuentran sobreexpresados. En relación a la expresión génica en LES II, hay genes sobreexpresados que incluyen el gen para el receptor FCGR2B, FOXP3, IL10, MARCO, OSCAR, STAT5A, CD55 y MAPK14, y genes subexpresados tales como CCR7, CTLA4, CD200 e IFNG.

Los cambios en la expresión génica más relevantes en LES I incluyen la subexpresión de genes antiapoptóticos como BCL2 y BCL2L1 y STAT3 y la sobreexpresión de genes como IL10Ra y TLR7. En relación a la expresión génica en LES II, el perfil inmune regulatorio se encuentre sobreexpresado al incluir genes como FCGR2B, FOXP3, IL10, MARCO, OSCAR, STAT5A, CD55 y MAPK14, pero con excepciones como la disminución de CTLA4 y genes proliferativos como CCR7, CD200 e IFNG. Si bien no se evidenció un perfil de expresión claro de los genes en base a su función, estos datos nos permiten ampliar los conocimientos sobre la heterogeneidad de LES y reafirmar la idea de que a pesar de la complejidad de esta enfermedad observada en pacientes y en distintos modelos murinos, PRLR es uno de los genes sobreexpresados en ambos grupos de pacientes.

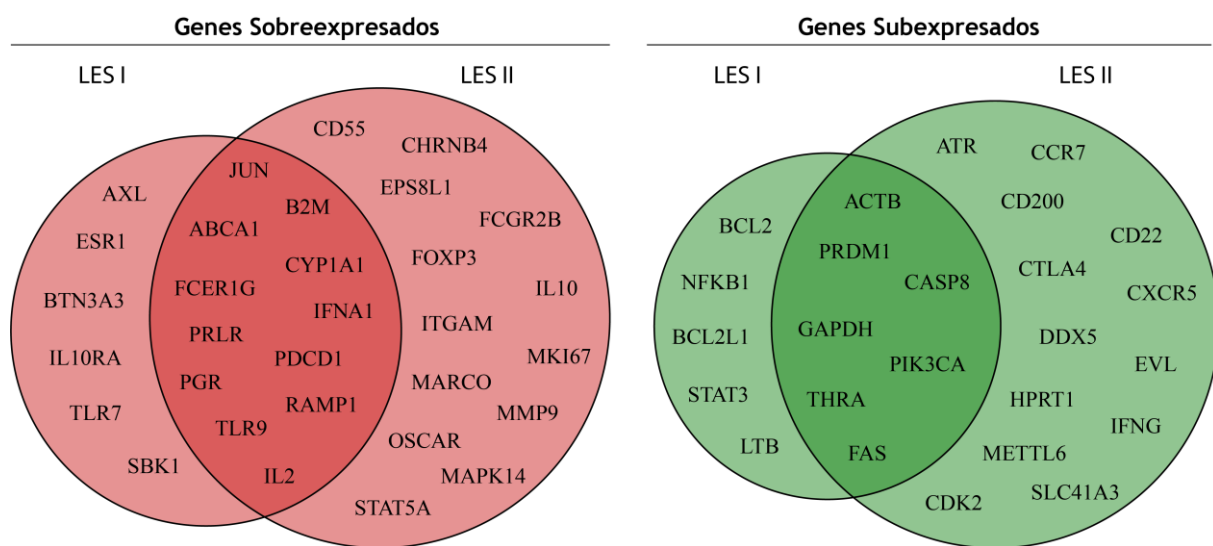


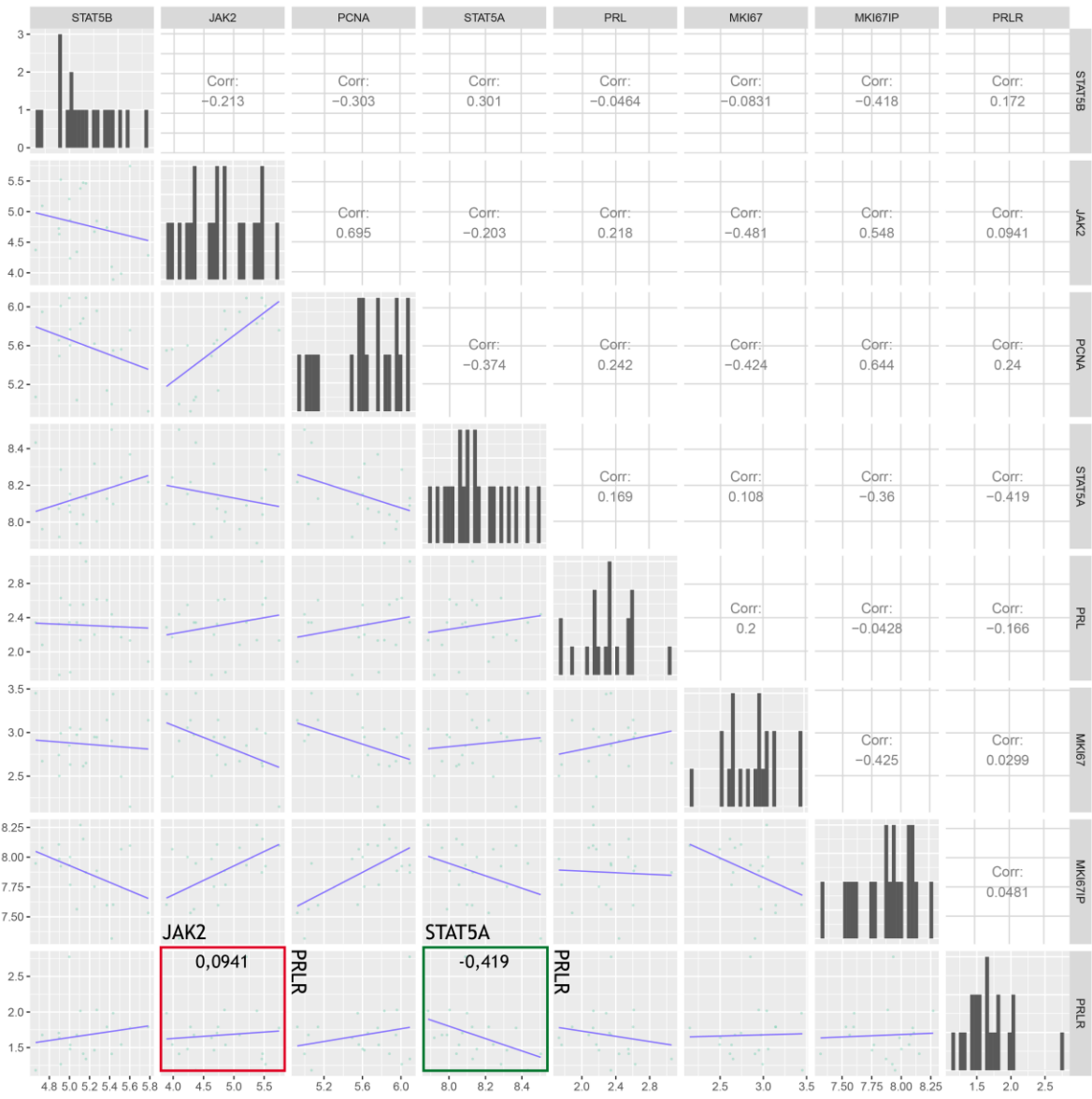
Figura 19. Diagrama de Venn analizando los genes sobre y subexpresados en pacientes del grupo LES I y LES II en relación al grupo control.

Análisis de correlación entre los niveles de expresión de PRL, PRL-R y genes que forman parte de las vías moleculares de STAT5 y STAT3

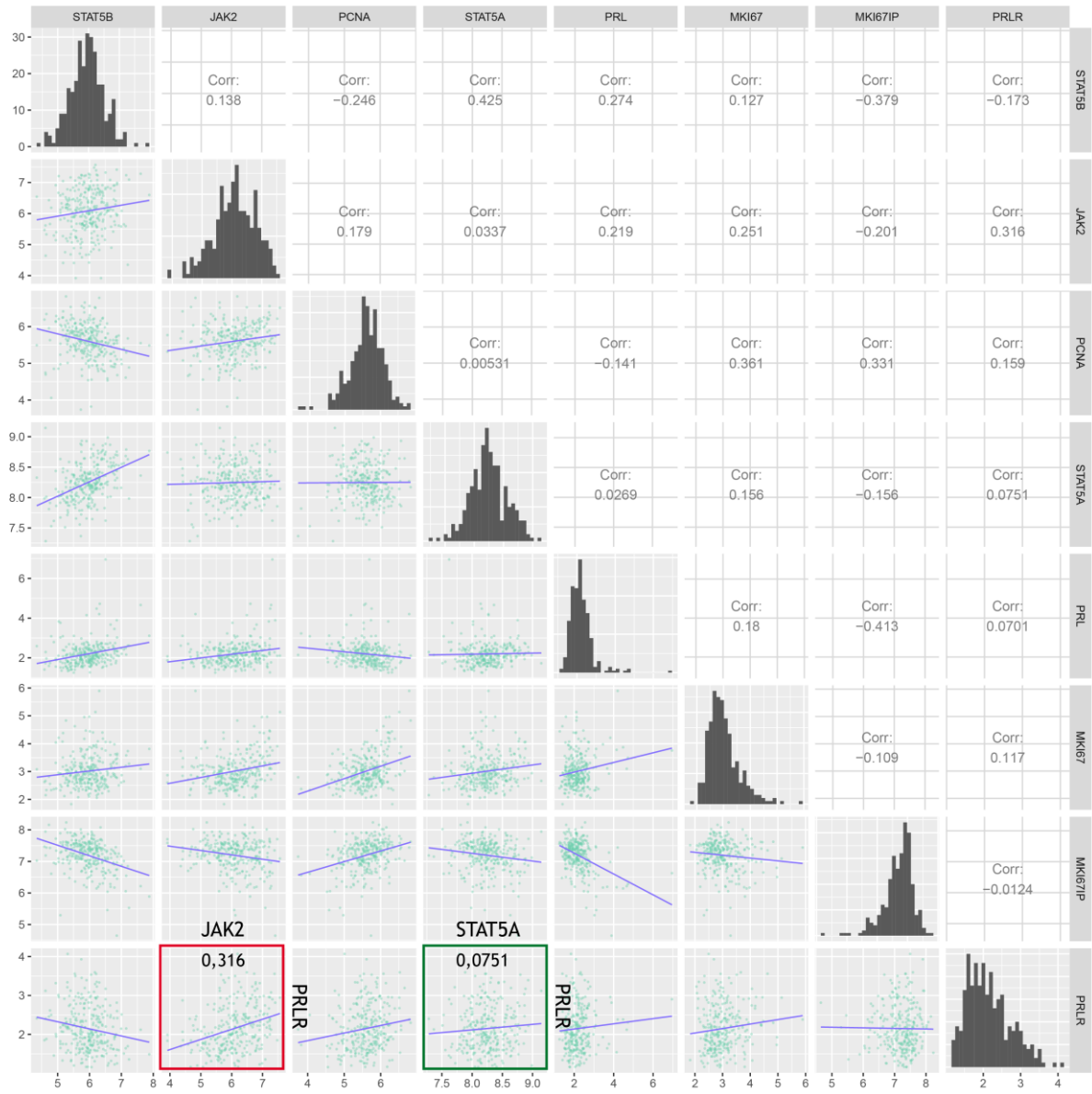
Teniendo en cuenta que nuestros datos indican que PRL-R muestra una expresión aumentada en individuos con LES, y conociendo que PRL actúa a través de la unión con su receptor activando diferentes vías de señalización como la vía de JAK/STAT5 y JAK/STAT3 (Flores-Fernandez et al., 2021; Jahn et al., 1997; Meshaal et al., 2016), nos preguntamos si

en nuestro set de datos génicos habría correlación entre PRL, su receptor y genes pertenecientes a las vías de señalización de STAT5 (JAK2, STAT5A, STAT5B, PCNA, MKI67 y MKI67IP) y STAT3 (JAK2, STAT3, MCL1, BIRC5, BCL2 y BCL2L1). Para visualizar los resultados se graficaron en la misma figura los coeficientes de correlación, los diagramas de dispersión junto con las rectas de regresión lineal y los histogramas para evaluar la distribución de los datos. Como podemos observar en la figura 20.A. y 20.B., existe una correlación positiva entre PRL-R y JAK2 en pacientes con LES que no se observa en individuos sanos. Esto sugiere que en pacientes con LES, un aumento de la expresión de PRL-R se correlaciona con un aumento en la expresión de JAK2. A su vez existe una correlación negativa entre PRL-R y STAT5A en individuos sanos, que no existe en pacientes con LES. Además, existe una correlación positiva entre PRL y STAT3, BCL2 y BCL2L1. en pacientes con LES que no se observa en individuos sanos (figura 20.C. y 20.D.). Teniendo en cuenta que las moléculas de STAT3, BCL2 y BCL2L1. están relacionadas con procesos antiapoptóticos, estos datos sugieren que las acciones de PRL en PMBC de pacientes con LES podrían estar asociadas a la vía de STAT3, aumentando así su sobrevida y evitando los mecanismos de tolerancia periférica. Estos resultados apoyan la idea de que PRL-R actúa en células inmunes como un modulador de la sobrevida celular, desencadenando principalmente procesos antiapoptóticos.

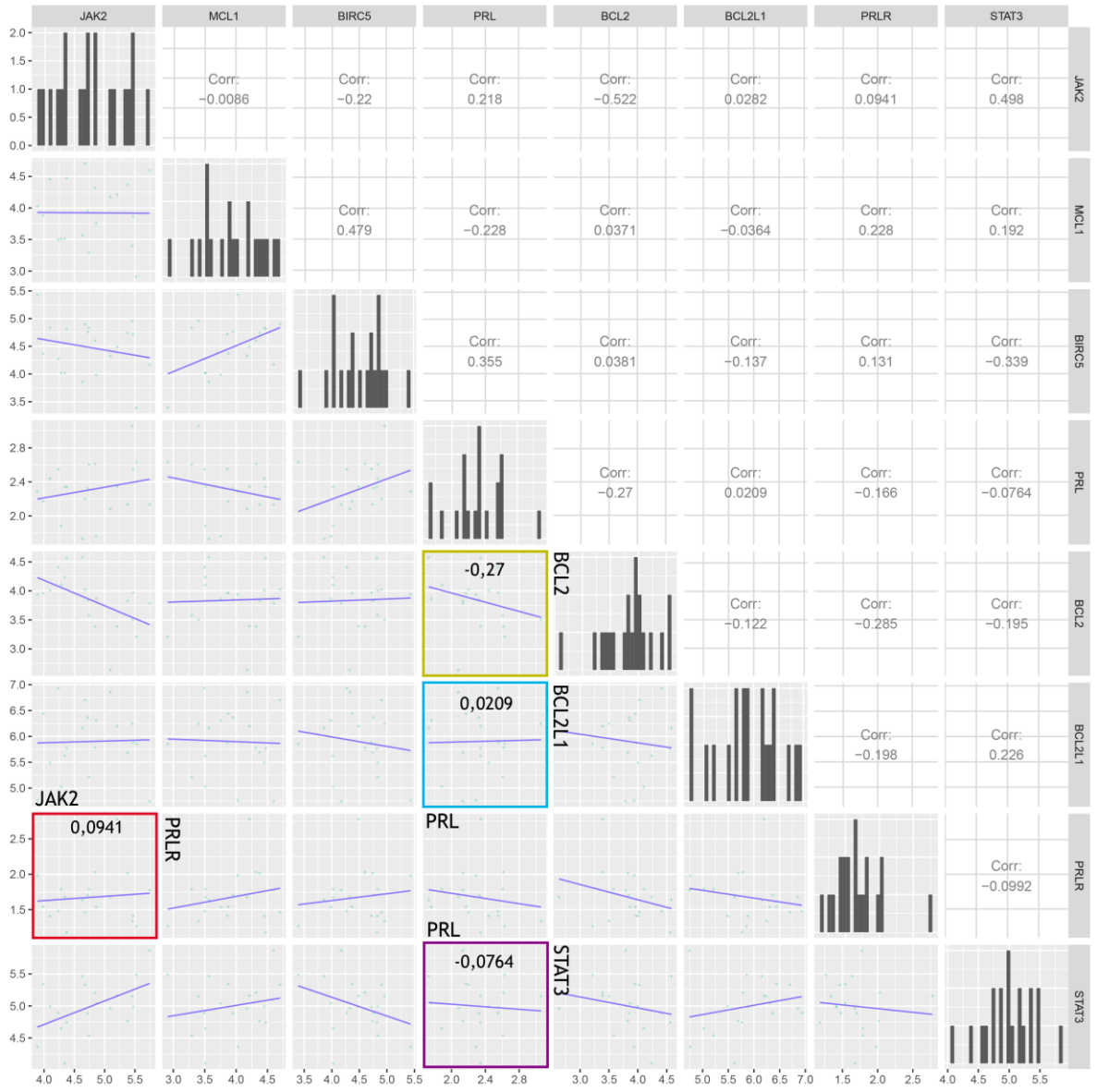
A. STAT5 - Control



B. STAT5 - LES



C. STAT3 - Control



D. STAT3 - LES

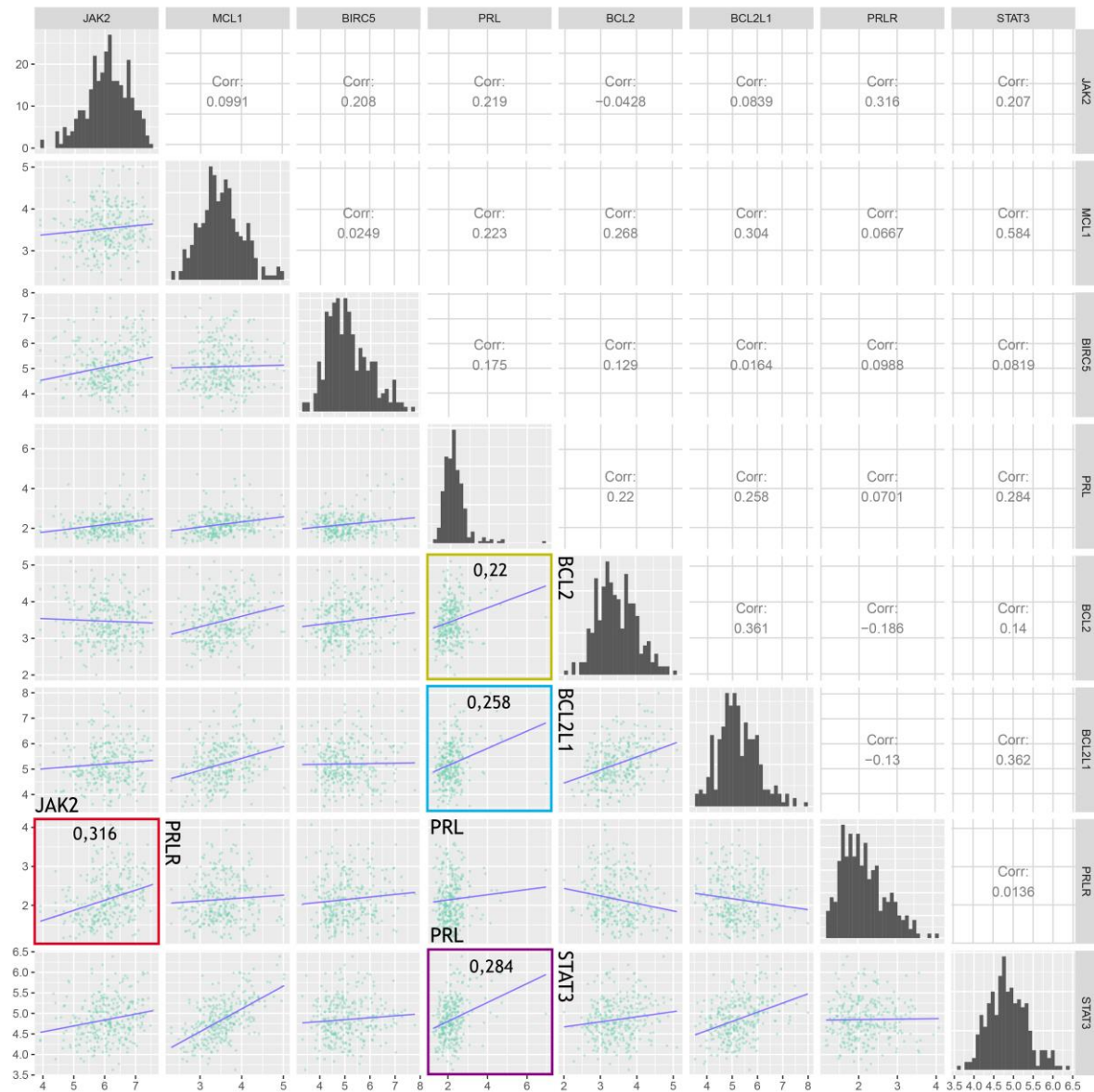


Figura 20. Análisis de correlaciones entre PRL, PRL-R y genes asociados a las vías de STAT5 y STAT3. **A** Vía STAT5 en individuos sanos; **B** Vía STAT5 en pacientes con LES; **C** Vía STAT3 en individuos sanos; **D** Vía STAT3 en pacientes con LES. Los recuadros hacen referencias a cambios significativos en las correlaciones estudiadas.

Discusión

Las hormonas sexuales y otras relacionadas a éstas, como PRL, modulan la respuesta inmune y se vinculan a numerosos procesos autoinmunes (Ben-Jonathan et al., 2008; Leite De Moraes et al., 1995; Peeva et al., 2003; Venkatesh et al., 2006). Uno de los aspectos más importantes de la modulación de la respuesta inmune por PRL incluye la inhibición de la apoptosis en timocitos (Krishnan et al., 2003), LT (Bauernhofer et al., 2003) y LB (Chou et al., 2006). Se ha observado que PRL-R está presente en células inmunes (Bauernhofer et al., 2003; De Mello-Coelho et al., 1998; Dorshkind and Horseman, 2000; Nagano and Kelly, 1994; Urtishak et al., 2001), sin embargo, su rol y modulación en condiciones saludables y no saludables es aún controversial (Lee et al., 2021).

En nuestro estudio hemos evidenciado la presencia de las isoformas larga y corta del PRL-R en esplenocitos murinos. Además, hemos podido demostrar que la isoforma larga del PRL-R se expresa en las poblaciones linfocitarias principales LT CD4⁺, LT CD8⁺ y LB CD19⁺. En estas mismas poblaciones no logramos detectar la presencia de la isoforma corta del receptor. La diferencia observada sobre la expresión de PRL-RS entre esplenocitos totales y linfocitos purificados podría deberse a una expresión muy baja del receptor, tanto así que, mediante las técnicas empleadas de purificación celular y detección del transcripto, los ARNm de baja expresión podrían degradarse más rápidamente al punto de no poder ser detectados. Estos resultados están de acuerdo con reportes previos en donde tampoco ha sido posible determinar la isoforma corta del receptor en poblaciones de linfocitos provenientes de médula ósea (Flores-Fernandez et al., 2021). Sin embargo, no podemos descartar que esta falta de detección de la isoforma corta pueda deberse a una sensibilidad inadecuada de los reactivos utilizados, y es posible que el uso de reactivos de alta eficiencia aumente las posibilidades de detección.

Es importante tener en cuenta que, a nivel metodológico, la identificación de las isoformas de PRL-R ha sido principalmente desarrollada mediante la detección de ARNm (Touraine et al., 1994). Sin embargo, también es posible la detección proteica de las mismas a través de un anticuerpo comercial que al reconocer la porción extracelular de PRL-R, no diferencia entre las isoformas del mismo detectando la expresión de PRL-R total (Cheal et al., 2018; Royster et al., 1995). Esto hace que la única forma de detectar de manera diferencial a las isoformas de PRL-R a nivel proteico sea utilizando este anticuerpo a través de Western Blot e identificando la presencia de las diferentes isoformas por migración diferencial en electroforesis de poliacrilamida gracias a las diferencias en su peso molecular (Asad et al., 2019; Rivera et al., 2008). Estudios en la línea celular de monocitos THP1 lograron

identificar la isoforma corta del receptor por PCR y WB (Lopez-Rincon et al., 2015). Sin embargo, debido a que es una línea celular inmortalizada la cantidad de actividad transcripcional es muy alta en comparación con cultivos primarios. Cuando evaluamos la expresión proteica del PRL-R total por citometría de flujo, observamos que la proporción de células que lo expresan es muy baja alcanzando un máximo de 3% y 15% en LT y LB, respectivamente. Se conoce que PRL-R se expresa en mayor cantidad en LB (Leite De Moraes et al., 1995) y en nuestro trabajo hemos podido confirmar esto. Al predominar la expresión de PRL-R en LB y dado que esta población es la más frecuente de las células de bazo, los datos obtenidos en los cultivos de esplenocitos podrían derivar principalmente de la respuesta a los estímulos, directa o indirectamente, sobre los LB.

Nuestros resultados indican que la expresión de PRL-R es dependiente de la población celular estudiada, ya que además de mostrar diferencias a nivel basal, muestra cambios en la respuesta frente a los distintos estímulos utilizados. En LB, la supresión inmune dada por Dexametasona desencadenó un aumento de la expresión del PRL-R mientras que la estimulación con ConA indujo una disminución en la expresión. A partir de estos resultados se podría especular que la disminución de la expresión de PRL-R luego de la estimulación con ConA podría estar ligada a una menor sensibilidad de la célula a la hormona durante una activación celular, para así contrarrestar las señales proliferativas o activadoras de PRL reportadas ampliamente (Chavez-Rueda et al., 2005; Takizawa et al., 2005; Xu et al., 2010). Sin embargo, no podemos descartar que este proceso se vincule a limitar la acción de PRL sobre los mecanismos de supervivencia celular. En este caso, la activación de PRL-R podría verse atenuada como mecanismo autorregulatorio generando así retroalimentación negativa e impidiendo así un excesivo o inadecuado desarrollo de la respuesta inmune. Existen numerosos mecanismos de autorregulación de la activación linfocitaria como, por ejemplo, el aumento de la expresión de PD-1 y CTLA-4 en LT luego de la estimulación del Receptor de Células T (TCR) (El Khatib et al., 2015; Jiang et al., 2021). Por el contrario, las cascadas de señalización moduladas por PRL en diferentes poblaciones leucocitarias (Bauernhofer et al., 2003; Flores-Fernandez et al., 2021; Legorreta-Haquet et al., 2013; Peeva and Zouali, 2005) apoyan nuestro modelo de que las células tratan de promover su supervivencia al aumentar la expresión de PRL-R y, por consiguiente, activar la cascada de señalización de vías antiapoptóticas. En nuestro caso, la inhibición evocada con Dexametasona, produciría un aumento de la sensibilidad a PRL, promoviendo así el señalamiento a través de PRL-R una vez que la hormona se une al mismo.

Además del rol sobre la supresión celular, se ha reportado que Dexa tiene un rol inductivo de la función supresora de LTreg por lo que el mecanismo de acción debiera ser diferente al observado en un LT efector (Kim et al., 2020). Nuestros datos sobre la tendencia al aumento de la expresión del PRL-R luego de la estimulación con Dexa en LTreg podrían estar relacionados con una mayor promoción de los efectos activadores de PRL sobre los LTreg aumentando así su funcionalidad supresora y reguladora de la respuesta inmune. Sin embargo, no podemos descartar que promoviendo un aumento de la sensibilidad a PRL dada por el aumento en su receptor largo, también se podría promover la supervivencia y así evitar la apoptosis.

Al evaluar la expresión y modulación de PRL-R en ratones propensos al desarrollo de LES de manera espontánea observamos un comportamiento diferente a la cepa control indicando que la homeostasis de PRL/PRL-R podría verse afectada en condiciones autoinmunes. A nivel *ex vivo*, se observa una mayor expresión de PRL-R en las cepas de ratones RIIb y FAS, en comparación a la cepa control. Este aumento en la expresión del receptor podría deberse a la deficiencia de receptores inhibitorios presentes en ambas cepas. Los ratones de la cepa RIIb, carecen del receptor FcγRIIb el cual está expresado principalmente en LB, macrófagos y CD8. Este receptor tiene un rol clave en la homeostasis de la respuesta inmune adaptativa humoral, y su ausencia se asocia con una hiperreactividad que deriva en enfermedades autoinmunes (Tarasenko et al., 2007). En el caso de la cepa FAS, por su parte, los ratones carecen del receptor Fas presente en muchas células linfoides, principalmente en LT. Este receptor contiene en su porción intracelular un "dominio de muerte"; cuando Fas se une a su ligando (FasL), se desencadena una serie de eventos que inducen la apoptosis de la propia célula en procesos tales como la eliminación de células autorreactivas (Strasser et al., 2009).

Al evaluar la expresión del PRL-R en modelos murinos lúpicos luego de 24h de cultivo en estado basal, no se observaron concordancias con los resultados obtenidos a nivel *ex vivo*, ya que la expresión de PRL-R a nivel basal en las cepas RIIb y FAS no se encontraba aumentada en relación a la cepa control. Estos cambios entre la expresión de proteínas/receptores entre el estado *ex vivo* e *in vitro* se ha observado en distintos estudios (Benveniste et al., 2019; McCormick et al., 2010) y podrían deberse principalmente a que las células *in vitro* pueden sufrir un conjunto diferente de eventos de selección y pérdida de microambiente, entre otras cosas (Benveniste et al., 2019). En la esclerosis múltiple, por ejemplo, se ha observado que, si bien los modelos *in vitro* permiten modelar diferentes aspectos de la enfermedad, se necesitan diferentes factores para imitar no solo las

características de la enfermedad en sí, sino también la inflamación y las causas reales del daño de los oligodendrocitos (Madill et al., 2016).

Al analizar lo que ocurría en esplenocitos, observamos que en las tres cepas lúpicas la expresión del ARNm de PRL-R no respondió a la estimulación con Dexa como la cepa control, sin evidenciar aumento en su expresión. En respuesta a ConA solo esplenocitos de ratones RIIb disminuyeron la expresión de PRL-R de manera similar a los ratones C57. Esta falta de respuesta a nivel de ARNm de esplenocitos de las cepas lúpicas estimulados con Dexa podría estar ligada a alteraciones en los mecanismos regulatorios de células inmunes carentes de receptores inhibitorios o que presentan el locus *Sle1* (Chang et al., 2014; Tarasenko et al., 2007; Yoachim et al., 2015). Se podría especular que al carecer de moléculas cruciales para la homeostasis celular frente a la estimulación como lo es el receptor inhibitorio $Fc\gamma RIIb$ o Fas, se presentaría una limitación sobre la sensibilidad a otros factores tróficos o regulatorios como sería el caso de PRL-R. Esta falta de respuesta por PRL/PRL-R a la estimulación o inhibición dada por el microambiente, podría traducirse en una mayor sobrevida por mecanismos aún no esclarecidos. A nivel proteico, observamos que la expresión de PRL-R en LB de ratones C57, RIIb y NZM se comportaban de la misma manera que a nivel de ARNm. La expresión de PRL-R en LB de ratones FAS que a nivel de ARNm mostraban una falta de respuesta frente a los estímulos de Dexa y ConA, mostraron un aumento de la expresión de PRL-R frente a Dexa y una disminución frente a ConA, tal como el grupo control. Las diferencias de los resultados obtenidos entre las muestras de ARNm y el análisis proteico para la expresión de PRL-R podrían deberse a diferencias de las poblaciones linfocitarias que dirigen la respuesta a PRL en cada una de las cepas. En esplenocitos de ratones FAS, y de acuerdo con nuestro análisis de expresión de PRL-R en timo, probablemente los cambios en la expresión del PRL-R a nivel de LT estén asociados a procesos posteriores a la ontogenia linfocitaria fuera del timo o como consecuencia de la aparición de la enfermedad.

En la etapa final de este proyecto de tesis analizamos la expresión de PRL-R a nivel génico y de ARNm en PBMC de individuos sanos y pacientes con LES. En primer lugar, pudimos observar que PBMC expresan la isoforma larga y corta (PRL-R1b) de PRL-R. De forma similar a reportes en pacientes con LES (Ledesma-Soto et al., 2012), y aunque nuestro hallazgo no alcanzó una significancia estadística, observamos un leve aumento en la expresión de PRL-RL en pacientes con LES en comparación al grupo control. Al evaluar la expresión del PRL-R1b observamos una leve disminución de la expresión en los pacientes lúpicos, sin embargo, esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa. Al lograr

cuantificar ambas isoformas del PRL-R, obtuvimos una visión más detallada de lo que podría estar ocurriendo con la sensibilidad a PRL. PRL-R sólo señala cuando se encuentra dimerizado y ambas isoformas pueden interaccionar entre sí y formar heterodímeros, por lo que la determinación de la relación de expresión entre ellas brinda más información que la que da la expresión de las isoformas individuales. De forma interesante, la relación entre ambas isoformas en pacientes con LES en relación a individuos sanos es el doble, sugiriendo que los pacientes lúpicos presentan una mayor sensibilidad a PRL. Para nuestro conocimiento, estos resultados son los primeros en señalar una relación alterada entre las diferentes isoformas del PRL-R en pacientes con LES. Utilizando un set de datos de la base GEO, observamos un resultado similar, en donde pacientes con LES mostraron un aumento en la expresión del PRL-R respecto de la población control, logrando validar los hallazgos en los pacientes enrolados en nuestro estudio. A diferencia de reportes sobre la existencia de una correlación entre los niveles de PRL y el índice de actividad de LES (Rezaieyazdi and Hesamifard, 2006), nuestros datos no revelaron relación alguna entre la expresión de PRL-R y el SLEDAI. Estos datos se asemejan a lo reportado por Karimifar en 2013 (Karimifar et al., 2013). Sin embargo, sí se observa una moderada relación entre la expresión de PRL-R y la duración de la enfermedad. Esta relación incluye una disminución de la expresión de la isoforma larga y un aumento de la isoforma corta a medida que avanzan los años de enfermedad. Cuando analizamos la relación de ambas isoformas también observamos que esta disminuye con la edad. El hecho de que PRL-R se encuentre más expresado en los primeros años de duración de la enfermedad se encuentra en línea con datos previamente publicados, en donde se observa que hay un aumento en la expresión de PRL-R de LB inmaduros de ratones MRL/MpJFAS^{lpr} al comienzo de la enfermedad (Flores-Fernandez et al., 2021). Lamentablemente, debido a la gran diversidad de los tratamientos en lupus y al tamaño de nuestra cohorte de pacientes no logramos correlacionar la expresión del PRL-R con los medicamentos utilizados. Sería muy interesante estudiar si pacientes lúpicos tratados con Dexametasona muestran mayor expresión de alguna de las isoformas del PRL-R.

El análisis bioinformático nos permitió por un lado verificar los resultados obtenidos en nuestra cohorte de pacientes y, por el otro, analizar otras características de los pacientes con LES. No logramos observar un agrupamiento exclusivo a nivel génico de individuos sanos y pacientes con LES en relación a los genes estudiados, y esto podría deberse al número reducido de genes que seleccionamos para el estudio (85 genes) y/o a la discrepancia entre el número de individuos sanos de la base de datos con relación al número de pacientes con LES. Sin embargo, los datos obtenidos en este análisis

bioinformático apoyan la idea de la gran heterogeneidad molecular del LES, que sostiene que esta enfermedad cursa con diferentes mutaciones producidas en un mismo gen, que dan lugar a un fenotipo único. (Banchereau et al., 2016). Para profundizar en el análisis de la expresión génica y relacionar la expresión de PRL-R con los pacientes con LES, desvinculamos del análisis los individuos sanos. Logramos observar que la población con LES se separa en dos grandes clusters de expresión génica que denominamos grupo LES I y LES II. Al analizar los genes sobre y subexpresados en estos dos grupos encontramos que ambos grupos comparten genes sobreexpresados (PRL-R, TLR9, IL2 e IFNA1) y subexpresados (FAS, CAS8, PIK3CA, entre otros). Sin embargo, otro grupo de genes sobre y subexpresados parecen ser exclusivos de cada grupo LES. Los cambios en la expresión génica más relevantes en LES I incluyen la subexpresión de genes antiapoptóticos como BCL2 y BCL2L1 y STAT3 y la sobreexpresión de genes como IL10Ra y TLR7. En relación a la expresión génica en LES II, llama la atención que el perfil inmune regulatorio se encuentre sobreexpresado al incluir genes como FCGR2B, FOXP3, IL10, MARCO, OSCAR, STAT5A, CD55 y MAPK14, pero a su vez disminuya la regulación negativa (CTLA4) y genes proliferativos como CCR7, CD200 e IFNG. Estos resultados sugieren que la expresión aumentada de genes involucrados en vías regulatorias del sistema inmune es un mecanismo importante frente a la autoreactividad en este grupo de pacientes. De manera interesante, uno de los genes sobreexpresados en los dos grupos de pacientes lúpicos fue el PRL-R. Es importante señalar que el PRL-R se encontró elevado en las distintas cepas lúpicas analizadas en esta tesis, en las que los mecanismos patogénicos propuestos son diferentes. De la misma manera, el PRL-R estuvo sobreexpresado en los grupos LES I y LES II analizados en este estudio, un conjunto 292 muestras de pacientes con distintas características clínicas y genéticas. Estos datos nos permiten ampliar los conocimientos sobre la heterogeneidad de LES, aunque más estudios son necesarios para comprender la diferencia entre ambos grupos y reafirmar la idea de que las terapias dirigidas personalizadas pueden ser un futuro prometedor para afrontar el tratamiento de esta patología.

Finalmente, dado que PRL induce respuestas celulares a través de distintas vías de señalización, incluyendo la vía de JAK2/STAT3 o STAT5 (Bratthauer et al., 2008; Olavarria et al., 2010; Tian et al., 2019), analizamos la correlación entre los niveles de expresión de PRL, PRL-R y moléculas de estas vías de señalización tanto en individuos sanos como en pacientes con LES para dilucidar si el receptor de nuestro interés está asociado a la activación de las mismas (Al-Sakkaf et al., 2000; Pedraz-Cuesta et al., 2016; Wang and Yu-

Lee, 1996). En el análisis pudimos observar una correlación positiva de PRL-R con JAK2 en los pacientes con LES, indicando que el aumento en la expresión de uno está ligado al aumento de expresión del otro. Por último, el aumento en la correlación entre PRL y las moléculas STAT3, BCL2 y BCL2.1 en pacientes con LES, sugiere la presencia de una asociación entre PRL y la vía antiapoptótica en pacientes lúpicos en relación al grupo control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el aumento de la expresión del receptor está ligado a la activación de vías antiapoptóticas en células inmunes, y se correlacionan con la bibliografía que menciona que PRL estaría actuando sobre los LB para evitar la selección negativa por mecanismos antiapoptóticos, promoviendo así la producción de autoanticuerpos (Flores-Fernandez et al., 2021). Sería importante profundizar en el estudio de los mecanismos de señalización que se desencadenan en células inmunes luego de los diferentes estímulos, para evaluar si tanto PRL como su receptor podrían estar involucrados en la respuesta de las células autorreactivas (Jara et al., 2017; Mellai et al., 2003; Strasser et al., 2009; Tarasenko et al., 2007). Si bien nuestros datos sobre el PRL-R indican que no podría ser utilizado como un marcador individual de LES debido al pequeño cambio en su expresión, es interesante destacar que podría estar interviniendo durante la activación, diferenciación y supervivencia linfocitaria. Además, podría verse involucrado en la respuesta autoinmune humoral gobernada por LB, tanto en la cepa de ratones RIIb y NZM como en los pacientes LES. De esta manera, estos resultados nos permiten aceptar la hipótesis de que la expresión del PRL-R está regulada de forma diferencial durante la activación e inhibición en células del sistema inmune. Nuestro hallazgo sobre la expresión y regulación diferencial alterada en LES sugiere que individuos con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes tienen alteraciones en el comportamiento fisiológico del receptor. Sin embargo, aún no podemos vincular directamente la patogénesis del lupus con una expresión alterada del PRL-R. Consideramos que es necesario llevar a cabo más estudios para profundizar sobre la respuesta de PRL-R frente a diferentes estímulos y en diferentes poblaciones celulares, para así observar el panorama completo de expresión.

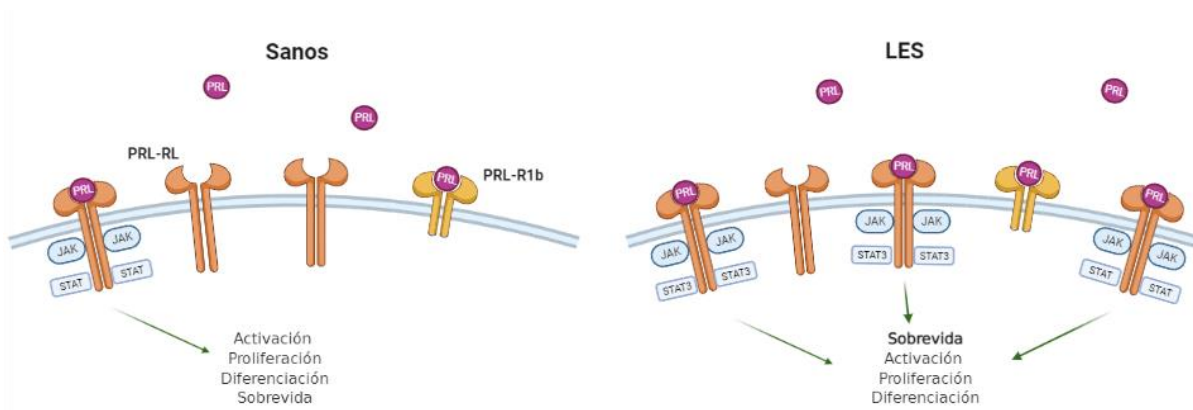


Figura 21. Modelo propuesto de la expresión de PRL-R en células inmunes de individuos sanos y pacientes con LES. El aumento de la expresión de PRL-R al inicio de la enfermedad en células de pacientes con LES estaría ligado a la activación de vías antiapoptóticas dirigidas probablemente por activación de JAK/STAT3. Esta activación se asocia con una mayor sobrevida celular. PRL: prolactina, PRL-RL: Receptor de prolactina largo, PRL-R1b: Receptor de prolactina corto humano. Imagen creada con BioRender.com.

Conclusiones

A partir de las actividades realizadas en la presente tesis doctoral observamos que

- Esplenocitos murinos expresan ambas isoformas de PRL-R. En poblaciones linfocitarias solo se detectó la isoforma PRL-RL.
- La expresión de PRL-R difiere en las distintas poblaciones linfocitarias siendo mayor en LB e induciendo un aumento en respuesta a Dexa y una disminución en respuesta a ConA.
- Hay diferencias en la modulación de PRL-R entre linfocitos autoinmunes y en comparación con los linfocitos sanos.
- PBMC humanas expresan PRL-RL y PRL-R1b, y la expresión génica de PRL-R es levemente mayor en pacientes con LES en relación a los individuos sanos.
- Hay mayor expresión de PRL-RL al comienzo de LES y esta expresión va disminuyendo a medida que avanza la enfermedad. Lo opuesto ocurre con la isoforma PRL-R1b.
- La correlación entre PRL-R y JAK, y entre PRL y las proteínas asociadas a vías antiapoptóticas STAT3, BCL2 y BCL2.1 se encuentra aumentada en pacientes con LES en relación al grupo control.

Esto nos permite concluir que individuos con LES tienen alteraciones en el comportamiento fisiológico de PRL-R. El aumento de la expresión de PRL-R observado en modelos lúpicos podría promover la mayor sobrevivencia celular, promoviendo así la perpetuación de la enfermedad.

Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras nos proponemos

- Estudiar las vías de señalización implicadas en la activación de PRL-R luego de la estimulación con PRL y estrógeno.
- Profundizar el estudio de la expresión de PRL-R en LTreg, analizando la expresión del mismo luego de la estimulación específica de LTreg con IL-2 y antiCD3/CD28.
- Aumentar el número de pacientes con LES e individuos control reclutados, para ampliar el estudio de las isoformas de PRL-R y su correlación con el SLEDAI y la duración de la enfermedad.
- Debido a la gran diversidad de los tratamientos en lupus y al tamaño de nuestra cohorte de pacientes no logramos correlacionar la expresión del PRL-R con los medicamentos utilizados. El aumento del número de pacientes nos permitirá también determinar si pacientes lúpicos tratados con Dexametasona muestran mayor expresión de alguna de las isoformas del PRL-R.
- Profundizar más en los análisis bioinformáticos, para comprender las diferencias encontradas entre los grupos LES I y LES II, y así seleccionar genes blancos para analizar luego a nivel *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.
- Estudiar los mecanismos de señalización que se desencadenan en las distintas poblaciones de células inmunes luego de los diferentes estímulos, para evaluar si tanto PRL como su receptor podrían estar involucrados en la respuesta autoinmune dirigida en células autorreactivas.

Bibliografía

- Abbas, A.K., Lohr, J., Knoechel, B., and Nagabhushanam, V. (2004). T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3, 471-475.
- Abul K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai (2012). *Inmunología Celular y Molecular*.
- Al-Sakkaf, K.A., Mooney, L.M., Dobson, P.R., and Brown, B.L. (2000). Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *J Endocrinol* 167, 85-92.
- Al Dhanhani, A.M., Agarwal, M., Othman, Y.S., and Bakoush, O. (2017). Incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus among the native Arab population in UAE. *Lupus* 26, 664-669.
- AlFadhli, S., Al-Mutairi, M., Al Tameemi, B., and Nizam, R. (2016). Influence of MX1 promoter rs2071430 G/T polymorphism on susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 35, 623-629.
- Antonio Blanco, G.B. (2015). *Química Biológica - 10° Edición Ampliada Y Actualizada*, Vol 10° Edición.
- Aringer, M., Costenbader, K., Daikh, D., Brinks, R., Mosca, M., Ramsey-Goldman, R., Smolen, J.S., Wofsy, D., Boumpas, D.T., Kamen, D.L., *et al.* (2019). 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 71, 1400-1412.
- Armstrong, D.L., Zidovetzki, R., Alarcon-Riquelme, M.E., Tsao, B.P., Criswell, L.A., Kimberly, R.P., Harley, J.B., Sivils, K.L., Vyse, T.J., Gaffney, P.M., *et al.* (2014). GWAS identifies novel SLE susceptibility genes and explains the association of the HLA region. *Genes Immun* 15, 347-354.
- Asad, A.S., Nicola Candia, A.J., Gonzalez, N., Zuccato, C.F., Abt, A., Orrillo, S.J., Lastra, Y., De Simone, E., Boutillon, F., Goffin, V., *et al.* (2019). Prolactin and its receptor as therapeutic targets in glioblastoma multiforme. *Sci Rep* 9, 19578.
- Banchereau, R., Hong, S., Cantarel, B., Baldwin, N., Baisch, J., Edens, M., Cepika, A.M., Acs, P., Turner, J., Anguiano, E., *et al.* (2016). Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell* 165, 1548-1550.
- Bashant, K.R., Aponte, A.M., Randazzo, D., Rezvan Sangsari, P., Wood, A.J., Bibby, J.A., West, E.E., Vassallo, A., Manna, Z.G., Playford, M.P., *et al.* (2021). Proteomic, biomechanical and functional analyses define neutrophil heterogeneity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 80, 209-218.
- Bauernhofer, T., Kuss, I., Friebe-Hoffmann, U., Baum, A.S., Dworacki, G., Vonderhaar, B.K., and Whiteside, T.L. (2003). Role of prolactin receptor and CD25 in protection of circulating T lymphocytes from apoptosis in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 88, 1301-1309.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., and LaPensee, E.W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29, 1-41.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., and Steinmetz, R.W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17, 639-669.
- Benveniste, P.M., Nakatsugawa, M., Nguyen, L., Ohashi, P.S., Hirano, N., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2019). In vitro-generated MART-1-specific CD8 T cells display a broader T-cell receptor repertoire than ex vivo naive and tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunol Cell Biol* 97, 427-434.
- Berlanga, J.J., Garcia-Ruiz, J.P., Perrot-Appianat, M., Kelly, P.A., and Edery, M. (1997). The short form of the prolactin (PRL) receptor silences PRL induction of the beta-casein gene promoter. *Mol Endocrinol* 11, 1449-1457.
- Bernard, V., Young, J., Chanson, P., and Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol* 11, 265-275.
- Bertsias, G.K., Tektonidou, M., Amoura, Z., Aringer, M., Bajema, I., Berden, J.H., Boletis, J., Cervera, R., Dorner, T., Doria, A., *et al.* (2012). Joint European League Against Rheumatism and European

Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 71, 1771-1782.

Biener, E., Martin, C., Daniel, N., Frank, S.J., Centonze, V.E., Herman, B., Djiane, J., and Gertler, A. (2003). Ovine placental lactogen-induced heterodimerization of ovine growth hormone and prolactin receptors in living cells is demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy and leads to prolonged phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 and STAT3. *Endocrinology* 144, 3532-3540.

Bignon, C., Sakal, E., Belair, L., Chapnik-Cohen, N., Djiane, J., and Gertler, A. (1994). Preparation of the extracellular domain of the rabbit prolactin receptor expressed in *Escherichia coli* and its interaction with lactogenic hormones. *J Biol Chem* 269, 3318-3324.

Boddaert, J., Huong, D.L.T., Amoura, Z., Wechsler, B., Godeau, P., and Piette, J.C. (2004). Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine (Baltimore)* 83, 348-359.

Bogorad, R.L., Courtillot, C., Mestayer, C., Bernichtein, S., Harutyunyan, L., Jomain, J.B., Bachelot, A., Kuttann, F., Kelly, P.A., Goffin, V., *et al.* (2008). Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14533-14538.

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

Boraschi, D., Castellano, L.R.C., and Italiani, P. (2017). Editorial: Interaction of Nanomaterials with the Immune System: Role in Nanosafety and Nanomedicine. *Front Immunol* 8, 1688.

Bouilly, J., Sonigo, C., Auffret, J., Gibori, G., and Binart, N. (2012). Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Mol Cell Endocrinol* 356, 80-87.

Bratthauer, G.L., Strauss, B.L., and Barner, R. (2008). Reversed Expression of the JAK/STAT Pathway Related Proteins Prolactin Receptor and STAT5a in Normal and Abnormal Breast Epithelial Cells. *Breast Cancer (Auckl)* 1, 7-14.

Buyon, J.P., Petri, M.A., Kim, M.Y., Kalunian, K.C., Grossman, J., Hahn, B.H., Merrill, J.T., Sammaritano, L., Lockshin, M., Alarcon, G.S., *et al.* (2005). The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 142, 953-962.

Cao, Y., Tang, W., and Tang, W. (2019). Immune cell infiltration characteristics and related core genes in lupus nephritis: results from bioinformatic analysis. *BMC Immunol* 20, 37.

Celhar, T., Magalhaes, R., and Fairhurst, A.M. (2012). TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res* 53, 58-77.

Chambers, S.A., Allen, E., Rahman, A., and Isenberg, D. (2009). Damage and mortality in a group of British patients with systemic lupus erythematosus followed up for over 10 years. *Rheumatology (Oxford)* 48, 673-675.

Chang, S.H., Kim, T.J., Kim, Y.J., Liu, Y., Min, S.Y., Park, M.J., Park, H.S., Lee, S.K., Nam, K.H., Kim, H.Y., *et al.* (2014). The lupus susceptibility locus *Sle1* facilitates the peripheral development and selection of anti-DNA B cells through impaired receptor editing. *J Immunol* 192, 5579-5585.

Chavez-Rueda, K., Hernandez, J., Zenteno, E., Leanos-Miranda, A., Legorreta-Haquet, M.V., and Blanco-Favela, F. (2005). Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol* 116, 182-191.

Cheal, S.M., Ruan, S., Veatch, D.R., Longo, V.A., Punzalan, B.J., Wu, J., Fung, E.K., Kelly, M.P., Kirshner, J.R., Giurleo, J.T., *et al.* (2018). ImmunoPET Imaging of Endogenous and Transfected Prolactin Receptor Tumor Xenografts. *Mol Pharm* 15, 2133-2141.

Chen, Y., Moutal, A., Navratilova, E., Kopruszinski, C., Yue, X., Ikegami, M., Chow, M., Kanazawa, I., Bellampalli, S.S., Xie, J., *et al.* (2020). The prolactin receptor long isoform regulates nociceptor sensitization and opioid-induced hyperalgesia selectively in females. *Sci Transl Med* 12.

Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., Nyman, J., Marjanovic, N.D., Kowalczyk, M.S., Wang, C., *et al.* (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* 558, 454-459.

Chodisetti, S.B., Fike, A.J., Domeier, P.P., Singh, H., Choi, N.M., Corradetti, C., Kawasawa, Y.I., Cooper, T.K., Caricchio, R., and Rahman, Z.S.M. (2020). Type II but Not Type I IFN Signaling Is Indispensable for TLR7-Promoted Development of Autoreactive B Cells and Systemic Autoimmunity. *J Immunol* 204, 796-809.

Chou, W.C., Levy, D.E., and Lee, C.K. (2006). STAT3 positively regulates an early step in B-cell development. *Blood* 108, 3005-3011.

Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417-428.

Clarke, D.L., and Linzer, D.I. (1993). Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology* 133, 224-232.

Clay, C.M., Cherrington, B.D., and Navratil, A.M. (2020). Plasticity of Anterior Pituitary Gonadotrope Cells Facilitates the Pre-Ovulatory LH Surge. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 616053.

Dagil, R., Knudsen, M.J., Olsen, J.G., O'Shea, C., Franzmann, M., Goffin, V., Teilum, K., Breinholt, J., and Kragelund, B.B. (2012). The WSXWS motif in cytokine receptors is a molecular switch involved in receptor activation: insight from structures of the prolactin receptor. *Structure* 20, 270-282.

Davis, S., and Meltzer, P.S. (2007). GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 23, 1846-1847.

De Mello-Coelho, V., Savino, W., Postel-Vinay, M.C., and Dardenne, M. (1998). Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Dev Immunol* 6, 317-323.

Degn, S.E., van der Poel, C.E., Firl, D.J., Ayoglu, B., Al Qureshah, F.A., Bajic, G., Mesin, L., Reynaud, C.A., Weill, J.C., Utz, P.J., *et al.* (2017). Clonal Evolution of Autoreactive Germinal Centers. *Cell* 170, 913-926 e919.

Deng, Y., and Tsao, B.P. (2014). Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol* 26, 482-492.

Dimitrov, S., Lange, T., Fehm, H.L., and Born, J. (2004). A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 18, 368-374.

Direk, N., Dekker, M.J., Luik, A.I., Kirschbaum, C., de Rijke, Y.B., Hofman, A., Hoogendijk, W.J., and Tiemeier, H. (2016). The Very Low-Dose Dexamethasone Suppression Test in the General Population: A Cross-Sectional Study. *PLoS One* 11, e0164348.

Dorshkind, K., and Horseman, N.D. (2000). The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev* 21, 292-312.

El Khatib, M.M., Sakuma, T., Tonne, J.M., Mohamed, M.S., Holditch, S.J., Lu, B., Kudva, Y.C., and Ikeda, Y. (2015). beta-Cell-targeted blockage of PD1 and CTLA4 pathways prevents development of autoimmune diabetes and acute allogeneic islets rejection. *Gene Ther* 22, 430-438.

Fairhurst, A.M., Hwang, S.H., Wang, A., Tian, X.H., Boudreaux, C., Zhou, X.J., Casco, J., Li, Q.Z., Connolly, J.E., and Wakeland, E.K. (2008). Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol* 38, 1971-1978.

Faliti, C.E., Gualtierotti, R., Rottoli, E., Gerosa, M., Perruzza, L., Romagnani, A., Pellegrini, G., De Ponte Conti, B., Rossi, R.L., Idzko, M., *et al.* (2019). P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 216, 317-336.

Fava, A., and Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J Autoimmun* 96, 1-13.

Flores-Fernandez, R., Aponte-Lopez, A., Suarez-Arriaga, M.C., Gorocica-Rosete, P., Pizana-Venegas, A., Chavez-Sanchez, L., Blanco-Favela, F., Fuentes-Panana, E.M., and Chavez-Rueda, A.K. (2021). Prolactin Rescues Immature B Cells from Apoptosis-Induced BCR-Aggregation through STAT3, Bcl2a1a, Bcl2l2, and Birc5 in Lupus-Prone MRL/lpr Mice. *Cells* 10.

Forsyth, I.A., and Wallis, M. (2002). Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 291-312.

Ganesh, B.B., Bhattacharya, P., Gopisetty, A., and Prabhakar, B.S. (2011). Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* 31, 721-731.

Gateva, V., Sandling, J.K., Hom, G., Taylor, K.E., Chung, S.A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R.C., Nordmark, G., *et al.* (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41, 1228-1233.

Gertler, A., Grosclaude, J., Strasburger, C.J., Nir, S., and Djiane, J. (1996). Real-time kinetic measurements of the interactions between lactogenic hormones and prolactin-receptor extracellular domains from several species support the model of hormone-induced transient receptor dimerization. *J Biol Chem* 271, 24482-24491.

Giles, A.J., Hutchinson, M.N.D., Sonnemann, H.M., Jung, J., Fecci, P.E., Ratnam, N.M., Zhang, W., Song, H., Bailey, R., Davis, D., *et al.* (2018). Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer* 6, 51.

Goffin, V., Martial, J.A., and Summers, N.L. (1995). Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng* 8, 1215-1231.

Golos, T.G., Durning, M., Fisher, J.M., and Fowler, P.D. (1993). Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology* 133, 1744-1752.

Gonzalez Lucero, L., Barbaglia, A.L., Bellomio, V.I., Bertolaccini, M.C., Machado Escobar, M.A., Sueldo, H.R., Yacuzzi, M.S., Carrizo, G.A., Robles, N., Rengel, S., *et al.* (2020). Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Tucuman, Argentina. *Lupus* 29, 1815-1820.

Gordon, R.A., Tilstra, J.S., Marinov, A., Nickerson, K.M., Bastacky, S.I., and Shlomchik, M.J. (2020). Murine lupus is neutrophil elastase-independent in the MRL.Fas^{lpr} model. *PLoS One* 15, e0226396.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* 13, 4361-4369.

Grattan, D.R., and Kokay, I.C. (2008). Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20, 752-763.

Gratz, I.K., Rosenblum, M.D., Maurano, M.M., Paw, J.S., Truong, H.A., Marshak-Rothstein, A., and Abbas, A.K. (2014). Cutting edge: Self-antigen controls the balance between effector and regulatory T cells in peripheral tissues. *J Immunol* 192, 1351-1355.

Grennan, D.M., Parfitt, A., Manolios, N., Huang, Q., Hyland, V., Dunckley, H., Doran, T., Gatenby, P., and Badcock, C. (1997). Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 13, 93-98.

Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., and Diamond, B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 109, 1625-1633.

Grimaldi, C.M., Jeganathan, V., and Diamond, B. (2006). Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol* 176, 2703-2710.

Grimaldi, C.M., Michael, D.J., and Diamond, B. (2001). Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J Immunol* 167, 1886-1890.

Guffroy, A., Gies, V., Martin, M., and Korganow, A.S. (2017). [Primary immunodeficiency and autoimmunity]. *Rev Med Interne* 38, 383-392.

Hahn, B.H. (2013). Belimumab for systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 368, 1528-1535.

Hahn, B.H., McMahon, M.A., Wilkinson, A., Wallace, W.D., Daikh, D.I., Fitzgerald, J.D., Karpouzas, G.A., Merrill, J.T., Wallace, D.J., Yazdany, J., *et al.* (2012). American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64, 797-808.

Han, J.W., Zheng, H.F., Cui, Y., Sun, L.D., Ye, D.Q., Hu, Z., Xu, J.H., Cai, Z.M., Huang, W., Zhao, G.P., *et al.* (2009). Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41, 1234-1237.

Harbige, J., Eichmann, M., and Peakman, M. (2017). New insights into non-conventional epitopes as T cell targets: The missing link for breaking immune tolerance in autoimmune disease? *J Autoimmun* 84, 12-20.

Hargraves, M.M., Richmond, H., and Morton, R. (1948). Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 23, 25-28.

Herman, A., Bignon, C., Daniel, N., Grosclaude, J., Gertler, A., and Djiane, J. (2000). Functional heterodimerization of prolactin and growth hormone receptors by ovine placental lactogen. *J Biol Chem* 275, 6295-6301.

Herold, K.C., Bundy, B.N., Long, S.A., Bluestone, J.A., DiMeglio, L.A., Dufort, M.J., Gitelman, S.E., Gottlieb, P.A., Krischer, J.P., Linsley, P.S., *et al.* (2019). An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* 381, 603-613.

Houssiau, F.A., and Ginzler, E.M. (2008). Current treatment of lupus nephritis. *Lupus* 17, 426-430.

Hu, Z.Z., Meng, J., and Dufau, M.L. (2001). Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem* 276, 41086-41094.

Isidori, A.M., Venneri, M.A., Graziadio, C., Simeoli, C., Fiore, D., Hasenmajer, V., Sbardella, E., Gianfrilli, D., Pozza, C., Pasqualetti, P., *et al.* (2018). Effect of once-daily, modified-release hydrocortisone versus standard glucocorticoid therapy on metabolism and innate immunity in patients with adrenal insufficiency (DREAM): a single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6, 173-185.

Jacobi, A.M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C., and Diamond, B. (2009). Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 4, e5776.

Jahn, G.A., Daniel, N., Jolivet, G., Belair, L., Bole-Feysot, C., Kelly, P.A., and Djiane, J. (1997). In vivo study of prolactin (PRL) intracellular signalling during lactogenesis in the rat: JAK/STAT pathway is activated by PRL in the mammary gland but not in the liver. *Biol Reprod* 57, 894-900.

Jara, L.J., Medina, G., Saavedra, M.A., Vera-Lastra, O., Torres-Aguilar, H., Navarro, C., Vazquez Del Mercado, M., and Espinoza, L.R. (2017). Prolactin has a pathogenic role in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res* 65, 512-523.

Jeay, S., Sonenshein, G.E., Postel-Vinay, M.C., Kelly, P.A., and Baixeras, E. (2002). Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 188, 1-7.

Jiang, X., Liu, G., Li, Y., and Pan, Y. (2021). Immune checkpoint: The novel target for antitumor therapy. *Genes Dis* 8, 25-37.

Jones, S.A., Cantsilieris, S., Fan, H., Cheng, Q., Russ, B.E., Tucker, E.J., Harris, J., Rudloff, I., Nold, M., Northcott, M., *et al.* (2019). Rare variants in non-coding regulatory regions of the genome that affect gene expression in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 9, 15433.

Justiz Vaillant, A.A., Goyal, A., Bansal, P., and Varacallo, M. (2020). Systemic Lupus Erythematosus. In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

Karimifar, M., Tahmasebi, A., Bonakdar, Z.S., and Purajam, S. (2013). Correlation of serum prolactin levels and disease activity in systematic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 33, 511-516.

Katsuyama, T., Tsokos, G.C., and Moulton, V.R. (2018). Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 9, 1088.

Kim, D., Nguyen, Q.T., Lee, J., Lee, S.H., Janocha, A., Kim, S., Le, H.T., Dvorina, N., Weiss, K., Cameron, M.J., *et al.* (2020). Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3(+) Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. *Immunity* 53, 581-596 e585.

Kim, S.J., Lee, K., and Diamond, B. (2018). Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 9, 1793.

Kim, S.J., Schatzle, S., Ahmed, S.S., Haap, W., Jang, S.H., Gregersen, P.K., Georgiou, G., and Diamond, B. (2017). Increased cathepsin S in Prdm1(-/-) dendritic cells alters the TFH cell repertoire and contributes to lupus. *Nat Immunol* 18, 1016-1024.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (2000). The thymus and central tolerance. *Clin Immunol* 95, S3-7.

Kline, J.B., and Clevenger, C.V. (2001). Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk. *J Biol Chem* 276, 24760-24766.

Konya, C., Paz, Z., Apostolidis, S.A., and Tsokos, G.C. (2015). Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases. *Cytokine* 75, 207-215.

Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D.J., Horseman, N.D., and Buckley, A.R. (2003). Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144, 2102-2110.

Ledesma-Soto, Y., Blanco-Favela, F., Fuentes-Panana, E.M., Tesoro-Cruz, E., Hernandez-Gonzalez, R., Arriaga-Pizano, L., Legorreta-Haquet, M.V., Montoya-Diaz, E., Chavez-Sanchez, L., Castro-Mussot, M.E., and Chavez-Rueda, A.K. (2012). Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment. *BMC Immunol* 13, 11.

Lee, D.S.W., Rojas, O.L., and Gommerman, J.L. (2021). B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov* 20, 179-199.

Legorreta-Haquet, M.V., Flores-Fernandez, R., Blanco-Favela, F., Fuentes-Panana, E.M., Chavez-Sanchez, L., Hernandez-Gonzalez, R., Tesoro-Cruz, E., Arriaga-Pizano, L., and Chavez-Rueda, A.K. (2013). Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Dev Immunol* 2013, 287469.

Leite De Moraes, M.C., Touraine, P., Gagnerault, M.C., Savino, W., Kelly, P.A., and Dardenne, M. (1995). Prolactin receptors and the immune system. *Ann Endocrinol (Paris)* 56, 567-570.

Li, D., Liang, G., Calderone, R., and Bellanti, J.A. (2019). Vitiligo and Hashimoto's thyroiditis: Autoimmune diseases linked by clinical presentation, biochemical commonality, and autoimmune/oxidative stress-mediated toxicity pathogenesis. *Med Hypotheses* 128, 69-75.

Li, P.H., Wong, W.H., Lee, T.L., Lau, C.S., Chan, T.M., Leung, A.M., Tong, K.L., Tse, N.K., Mok, C.C., Wong, S.N., *et al.* (2013). Relationship between autoantibody clustering and clinical subsets in SLE: cluster and association analyses in Hong Kong Chinese. *Rheumatology (Oxford)* 52, 337-345.

Li, Y., Wallis, M., and Zhang, Y.P. (2005). Episodic evolution of prolactin receptor gene in mammals: coevolution with its ligand. *J Mol Endocrinol* 35, 411-419.

Lim, S.S., Bayakly, A.R., Helmick, C.G., Gordon, C., Easley, K.A., and Drenkard, C. (2014). The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol* 66, 357-368.

Lopez-Rincon, G., Mancilla, R., Pereira-Suarez, A.L., Martinez-Neri, P.A., Ochoa-Zarzosa, A., Munoz-Valle, J.F., and Estrada-Chavez, C. (2015). Expression of autocrine prolactin and the short isoform of prolactin receptor are associated with inflammatory response and apoptosis in monocytes stimulated with *Mycobacterium bovis* proteins. *Exp Mol Pathol* 98, 517-526.

Mackern-Oberti, J.P., Jara, E.L., Riedel, C.A., and Kalergis, A.M. (2017). Hormonal Modulation of Dendritic Cells Differentiation, Maturation and Function: Implications for the Initiation and Progress of Systemic Autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 65, 123-136.

Mackern-Oberti, J.P., Valdez, S.R., Vargas-Roig, L.M., and Jahn, G.A. (2013). Impaired mammary gland T cell population during early lactation in hypoprolactinemic lactation-deficient rats. *Reproduction* 146, 233-242.

Madill, M., Fitzgerald, D., O'Connell, K.E., Dev, K.K., Shen, S., and FitzGerald, U. (2016). In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. *Drug Discov Today* 21, 1504-1511.

Maria, N.I., Vogelsang, P., and Versnel, M.A. (2015). The clinical relevance of animal models in Sjogren's syndrome: the interferon signature from mouse to man. *Arthritis Res Ther* 17, 172.

Martin, W.J., Steer, A.C., Smeesters, P.R., Keeble, J., Inouye, M., Carapetis, J., and Wicks, I.P. (2015). Post-infectious group A streptococcal autoimmune syndromes and the heart. *Autoimmun Rev* 14, 710-725.

McCormick, P.N., Kapur, S., Graff-Guerrero, A., Raymond, R., Nobrega, J.N., and Wilson, A.A. (2010). The antipsychotics olanzapine, risperidone, clozapine, and haloperidol are D2-selective ex vivo but not in vitro. *Neuropsychopharmacology* 35, 1826-1835.

Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606-616.

Mehrian, R., Quismorio, F.P., Jr., Strassmann, G., Stimmler, M.M., Horwitz, D.A., Kitridou, R.C., Gauderman, W.J., Morrison, J., Brautbar, C., and Jacob, C.O. (1998). Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 596-602.

Mellai, M., Giordano, M., D'Alfonso, S., Marchini, M., Scorza, R., Danieli, M.G., Leone, M., Ferro, I., Liguori, M., Trojano, M., *et al.* (2003). Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 64, 274-284.

Meshaal, S., El Refai, R., El Saie, A., and El Hawary, R. (2016). Signal transducer and activator of transcription 5 is implicated in disease activity in adult and juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 35, 1515-1520.

Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., and Tanaka, K. (2018). The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nat Immunol* 19, 923-931.

Nagafuchi, Y., Shoda, H., and Fujio, K. (2019). Immune Profiling and Precision Medicine in Systemic Lupus Erythematosus. *Cells* 8.

Nagano, M., and Kelly, P.A. (1994). Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 269, 13337-13345.

Namjou, B., Kothari, P.H., Kelly, J.A., Glenn, S.B., Ojwang, J.O., Adler, A., Alarcon-Riquelme, M.E., Gallant, C.J., Boackle, S.A., Criswell, L.A., *et al.* (2011). Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun* 12, 270-279.

Newey, P.J., Gorvin, C.M., Cleland, S.J., Willberg, C.B., Bridge, M., Azharuddin, M., Drummond, R.S., van der Merwe, P.A., Klenerman, P., Bountra, C., and Thakker, R.V. (2013). Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia. *N Engl J Med* 369, 2012-2020.

Ocampo Daza, D., and Larhammar, D. (2018). Evolution of the receptors for growth hormone, prolactin, erythropoietin and thrombopoietin in relation to the vertebrate tetraploidizations. *Gen Comp Endocrinol* 257, 143-160.

Oftedal, B.E., Hellesø, A., Erichsen, M.M., Bratland, E., Vardi, A., Perheentupa, J., Kemp, E.H., Fiskerstrand, T., Viken, M.K., Weetman, A.P., *et al.* (2015). Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. *Immunity* 42, 1185-1196.

Oglesby, A., Shaul, A.J., Pokora, T., Paramore, C., Cragin, L., Dennis, G., Narayanan, S., and Weinstein, A. (2013). Adverse event burden, resource use, and costs associated with immunosuppressant medications for the treatment of systemic lupus erythematosus: a systematic literature review. *Int J Rheumatol* 2013, 347520.

Olavarria, V.H., Sepulcre, M.P., Figueroa, J.E., and Mulero, V. (2010). Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1 β in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF- κ B signaling pathways. *J Immunol* 185, 3873-3883.

Orbach, H., Zandman-Goddard, G., Amital, H., Barak, V., Szekanecz, Z., Szucs, G., Danko, K., Nagy, E., Csepány, T., Carvalho, J.F., *et al.* (2007). Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1109, 385-400.

Ostensen, M., Andreoli, L., Brucato, A., Cetin, I., Chambers, C., Clowse, M.E., Costedoat-Chalumeau, N., Cutolo, M., Dolhain, R., Fenstad, M.H., *et al.* (2015). State of the art: Reproduction and pregnancy in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 14, 376-386.

Pamuk, O.N., Akbay, F.G., Donmez, S., Yilmaz, N., Calayir, G.B., and Yavuz, S. (2013). The clinical manifestations and survival of systemic lupus erythematosus patients in Turkey: report from two centers. *Lupus* 22, 1416-1424.

Pandolfi, J., Baz, P., Fernandez, P., Discianni Lupi, A., Payaslian, F., Billordo, L.A., Fainboim, L., and Arruvito, L. (2013). Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by Dexamethasone. *Clin Immunol* 149, 400-410.

Paraiba, D.B., Soares, C.R., Bartolini, P., Arthuso, F.S., Borba, E.F., Bonfa, E., and Bronstein, M.D. (2010). Lymphocytic prolactin does not contribute to systemic lupus erythematosus hyperprolactinemia. *Clin Exp Rheumatol* 28, 866-872.

Pedraz-Cuesta, E., Fredsted, J., Jensen, H.H., Bornebusch, A., Nejsun, L.N., Kragelund, B.B., and Pedersen, S.F. (2016). Prolactin Signaling Stimulates Invasion via Na(+)/H(+) Exchanger NHE1 in T47D Human Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 30, 693-708.

Peeva, E., Michael, D., Cleary, J., Rice, J., Chen, X., and Diamond, B. (2003). Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* 111, 275-283.

Peeva, E., and Zouali, M. (2005). Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 101, 123-143.

Petri, M., Fu, W., Ranger, A., Allaire, N., Cullen, P., Magder, L.S., and Zhang, Y. (2019). Association between changes in gene signatures expression and disease activity among patients with systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genomics* 12, 4.

Qazi, A.M., Tsai-Morris, C.H., and Dufau, M.L. (2006). Ligand-independent homo- and heterodimerization of human prolactin receptor variants: inhibitory action of the short forms by heterodimerization. *Mol Endocrinol* 20, 1912-1923.

Qian, Q., Liuqin, L., Hao, L., Shiwen, Y., Zhongping, Z., Dongying, C., Fan, L., Hanshi, X., Xiuyan, Y., and Yujin, Y. (2015). The effects of bromocriptine on preventing postpartum flare in systemic lupus erythematosus patients from South China. *J Immunol Res* 2015, 316965.

Recalde, G., Moreno-Sosa, T., Yudica, F., Quintero, C.A., Sanchez, M.B., Jahn, G.A., Kalergis, A.M., and Mackern-Oberti, J.P. (2018). Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmun Rev* 17, 504-512.

Rezaieyazdi, Z., and Hesamifard, A. (2006). Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatol Int* 26, 1036-1039.

Richez, C., Blanco, P., Rifkin, I., Moreau, J.F., and Schaefferbeke, T. (2011). Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 78, 124-130.

Rigby, R.J., Fernando, M.M., and Vyse, T.J. (2006). Mice, humans and haplotypes--the hunt for disease genes in SLE. *Rheumatology (Oxford)* 45, 1062-1067.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47.

Rivera, J.C., Aranda, J., Riesgo, J., Nava, G., Thebault, S., Lopez-Barrera, F., Ramirez, M., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2008). Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res* 86, 314-321.

Royster, M., Driscoll, P., Kelly, P.A., and Freemark, M. (1995). The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. *Endocrinology* 136, 3892-3900.

Rozakis-Adcock, M., and Kelly, P.A. (1991). Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 266, 16472-16477.

Rozakis-Adcock, M., and Kelly, P.A. (1992). Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 267, 7428-7433.

Ryden, A.K., Wesley, J.D., Coppieters, K.T., and Von Herrath, M.G. (2014). Non-antigenic and antigenic interventions in type 1 diabetes. *Hum Vaccin Immunother* 10, 838-846.

Sanchez-Guerrero, J., Karlson, E.W., Liang, M.H., Hunter, D.J., Speizer, F.E., and Colditz, G.A. (1997). Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40, 804-808.

Sangeeta Devi, Y., and Halperin, J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 382, 400-410.

Santulli-Marotto, S., Qian, Y., Ferguson, S., and Clarke, S.H. (2001). Anti-Sm B cell differentiation in Ig transgenic MRL/Mp-lpr/lpr mice: altered differentiation and an accelerated response. *J Immunol* 166, 5292-5299.

Schafflick, D., Xu, C.A., Hartlehnert, M., Cole, M., Schulte-Mecklenbeck, A., Lautwein, T., Wolbert, J., Heming, M., Meuth, S.G., Kuhlmann, T., *et al.* (2020). Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun* 11, 247.

Scolnik, M., Marin, J., Valeiras, S.M., Marchese, M.F., Talani, A.S., Avellaneda, N.L., Etchepare, A., Etchepare, P., Plou, M.S., and Soriano, E.R. (2014). Incidence and prevalence of lupus in Buenos Aires, Argentina: a 11-year health management organisation-based study. *Lupus Sci Med* 1, e000021.

Sebastiani, G.D., Prevete, I., Iuliano, A., and Minisola, G. (2016). The Importance of an Early Diagnosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Isr Med Assoc J* 18, 212-215.

Somers, E.C., Marder, W., Cagnoli, P., Lewis, E.E., DeGuire, P., Gordon, C., Helmick, C.G., Wang, L., Wing, J.J., Dhar, J.P., *et al.* (2014). Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol* 66, 369-378.

Stohl, W., Yu, N., Chalmers, S., Putterman, C., and Jacob, C.O. (2020). Development of Murine Systemic Lupus Erythematosus in the Absence of BAFF. *Arthritis Rheumatol* 72, 292-302.

Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.

Surawut, S., Panpetch, W., Makjaroen, J., Tangtanatakul, P., Thim-Uam, A., Wongphoom, J., Tumwasorn, S., and Leelahavanichkul, A. (2018). *Helicobacter pylori* Infection Increased Anti-dsDNA

and Enhanced Lupus Severity in Symptomatic FcgammaRIIb-Deficient Lupus Mice. *Front Microbiol* 9, 1488.

Suurmond, J., Zou, Y.R., Kim, S.J., and Diamond, B. (2015). Therapeutics to block autoantibody initiation and propagation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 7, 280ps285.

Takizawa, K., Kitani, S., Takeuchi, F., and Yamamoto, K. (2005). Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J* 52, 635-641.

Tan, E.M. (1991). Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67, 841-842.

Tanaka, Y. (2020). State-of-the-art treatment of systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 23, 465-471.

Tarasenko, T., Dean, J.A., and Bolland, S. (2007). FcgammaRIIB as a modulator of autoimmune disease susceptibility. *Autoimmunity* 40, 409-417.

Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 18, 716-724.

Tian, R.H., Bai, Y., Li, J.Y., and Guo, K.M. (2019). Reducing PRLR expression and JAK2 activity results in an increase in BDNF expression and inhibits the apoptosis of CA3 hippocampal neurons in a chronic mild stress model of depression. *Brain Res* 1725, 146472.

Tilstra, J.S., Avery, L., Menk, A.V., Gordon, R.A., Smita, S., Kane, L.P., Chikina, M., Delgoffe, G.M., and Shlomchik, M.J. (2018). Kidney-infiltrating T cells in murine lupus nephritis are metabolically and functionally exhausted. *J Clin Invest* 128, 4884-4897.

Tilstra, J.S., John, S., Gordon, R.A., Leibler, C., Kashgarian, M., Bastacky, S., Nickerson, K.M., and Shlomchik, M.J. (2020). B cell-intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *J Clin Invest* 130, 3172-3187.

Tomer, Y., and Huber, A. (2009). The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun* 32, 231-239.

Toro-Dominguez, D., Martorell-Marugan, J., Goldman, D., Petri, M., Carmona-Saez, P., and Alarcon-Riquelme, M.E. (2018). Stratification of Systemic Lupus Erythematosus Patients Into Three Groups of Disease Activity Progression According to Longitudinal Gene Expression. *Arthritis Rheumatol* 70, 2025-2035.

Touraine, P., Leite de Moraes, M.C., Dardenne, M., and Kelly, P.A. (1994). Expression of short and long forms of prolactin receptor in murine lymphoid tissues. *Mol Cell Endocrinol* 104, 183-190.

Urtishak, S.L., McKenna, E.A., and Mastro, A.M. (2001). Prolactin and prolactin receptor expression in rat, small intestine, intraepithelial lymphocytes during neonatal development. *Dev Immunol* 8, 319-330.

Valdez, S.R., Bonafede, M.M., Carreno, N.B., Deis, R.P., and Jahn, G.A. (2012). Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague Dawley rats. *Stress* 15, 361-377.

Valdez, S.R., Penissi, A.B., Deis, R.P., and Jahn, G.A. (2007). Hormonal profile and reproductive performance in lactation deficient (OFA hr/hr) and normal (Sprague-Dawley) female rats. *Reproduction* 133, 827-840.

Varas, S.M., and Jahn, G.A. (2005). The expression of estrogen, prolactin, and progesterone receptors in mammary gland and liver of female rats during pregnancy and early postpartum: regulation by thyroid hormones. *Endocr Res* 31, 357-370.

Vasquez-Canizares, N., Wahezi, D., and Putterman, C. (2017). Diagnostic and prognostic tests in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31, 351-363.

Venkatesh, J., Peeva, E., Xu, X., and Diamond, B. (2006). Cutting Edge: Hormonal milieu, not antigenic specificity, determines the mature phenotype of autoreactive B cells. *J Immunol* 176, 3311-3314.

Verbeek, J.S., Hirose, S., and Nishimura, H. (2019). The Complex Association of FcγRIIb With Autoimmune Susceptibility. *Front Immunol* 10, 2061.

Vlahakos, D.V., Foster, M.H., Adams, S., Katz, M., Ucci, A.A., Barrett, K.J., Datta, S.K., and Madaio, M.P. (1992). Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. *Kidney Int* 41, 1690-1700.

Wallis, M. (1996). The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *J Mol Evol* 43, 93-100.

Wallis, O.C., Zhang, Y.P., and Wallis, M. (2001). Molecular evolution of GH in primates: characterisation of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change. *J Mol Endocrinol* 26, 249-258.

Wan Asyraf, W.A., Mohd Shahrir, M.S., Asrul, W., Norasyikin, A.W., Hanita, O., Kong, W.Y., and Azmi, M.T. (2018). The association between serum prolactin levels and interleukin-6 and systemic lupus erythematosus activity. *Reumatismo* 70, 241-250.

Wang, Y.F., and Yu-Lee, L.Y. (1996). Multiple stat complexes interact at the interferon regulatory factor-1 interferon-gamma activation sequence in prolactin-stimulated Nb2 T cells. *Mol Cell Endocrinol* 121, 19-28.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374-1377.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.

Woods, M., Zou, Y.R., and Davidson, A. (2015). Defects in Germinal Center Selection in SLE. *Front Immunol* 6, 425.

Xu, D., Lin, L., Lin, X., Huang, Z., and Lei, Z. (2010). Immunoregulation of autocrine prolactin: suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown. *Cell Immunol* 263, 71-78.

Yang, L., Hu, Y., Li, X., Zhao, J., and Hou, Y. (2006). Prolactin modulates the functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 6, 1478-1486.

Yang, X.Y., Wang, H.Y., Zhao, X.Y., Wang, L.J., Lv, Q.H., and Wang, Q.Q. (2013). Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 33, 767-774.

Yin, Y., Choi, S.C., Xu, Z., Perry, D.J., Seay, H., Croker, B.P., Sobel, E.S., Brusko, T.M., and Morel, L. (2015). Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. *Sci Transl Med* 7, 274ra218.

Yoachim, S.D., Nuxoll, J.S., Bynote, K.K., and Gould, K.A. (2015). Estrogen receptor alpha signaling promotes Sle1-induced loss of tolerance and immune cell activation and is responsible for sex bias in B6.Sle1 congenic mice. *Clin Immunol* 158, 153-166.

Yurkovich, M., Vostretsova, K., Chen, W., and Avina-Zubieta, J.A. (2014). Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 66, 608-616.

Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Rao, D.A., Kelly, S., Goodman, S.M., Tabechian, D., Hughes, L.B., Salomon-Escoto, K., *et al.* (2019). Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 20, 928-942.

Anexo

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN BASICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La información detallada a continuación tiene como objetivo notificar a los participantes sobre las características del proyecto de investigación titulado ***“Desarrollo de un nuevo marcador biológico para enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico basado en el estudio de las diferentes isoformas del receptor de prolactina en Linfocitos”***.

Investigador Responsable: Dr. Juan Pablo Mackern Oberti

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo del presente proyecto es estudiar cuántas proteínas que interaccionan con la hormona prolactina se encuentran en una célula del sistema inmune de la sangre.

El éxito del proyecto nos permitirá desarrollar herramientas médicas para el seguimiento de enfermedades como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

Su participación en este trabajo nos permitirá profundizar nuestro conocimiento acerca de las enfermedades autoinmunes.

El presente documento detalla precisamente las características del estudio en el cual usted está invitado cordialmente a participar. También se detallan sus derechos y la responsabilidad del médico y los investigadores intervinientes hacia usted.

Por favor, lea detenidamente este formulario asegurándose de comprender todo lo contenido dentro del mismo antes de tomar una decisión respecto a su participación en el presente estudio. Una copia del presente documento denominado consentimiento firmado se le entregará al participante.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO DONDE ESTA INVOLUCRADO EL PARTICIPANTE

1. Los individuos en carácter de voluntarios, que hayan decidido participar del presente estudio otorgando así su consentimiento, podrán acercarse a la unidad de toma de muestras donde se les realizará una punción venosa para obtener una muestra de sangre de 40ml que equivale a media taza de café con la cual podremos extraer los leucocitos (glóbulos blancos) de interés. Esta muestra será utilizada para estudiar las diferentes moléculas de interés relacionadas con el receptor de prolactina. No se harán estudios genéticos en estas muestras.

FIRMA PARTICIPANTE _____

2. Los investigadores y personal médico del presente estudio le realizarán una pequeña entrevista para obtener detalles sobre su enfermedad los cuales serán examinados y utilizados por los investigadores responsables.

BENEFICIOS CLINICOS DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO

Si Usted acepta participar en este estudio, no obtendrá beneficios médicos directos. Sin embargo, esperamos que la información obtenida a partir de este estudio beneficie en un futuro a pacientes con enfermedades autoinmunes. Con su participación, Ud. estará ayudando al desarrollo de herramientas clínicas para el tratamiento y seguimiento de pacientes con enfermedades autoinmunes.

No tendrá beneficios directos para el diagnóstico ni tratamiento de su enfermedad.

BENEFICIOS ECONOMICOS DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO

Si usted ha decidido participar del presente estudio no obtendrá ningún tipo de beneficio económico, financiero por parte del mismo para usted o a algún tercero, por lo que renuncia expresamente y definitivamente a cualquier reclamo y/o acción legal y penal que le pudiere corresponder.

COSTOS POR PARTE DEL PARTICIPANTE

La participación voluntaria en el presente estudio no tiene costo alguno, ni le ocasionará gastos adicionales.

Este estudio es financiado a través de fondos ROEMMERS, CONICET y PICT.

CONFIDENCIALIDAD SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS

Las muestras de sangre serán codificadas y sólo el investigador conocerá su nombre. La información obtenida será de uso científico y no será divulgada con otros fines. Esa información podrá ser publicada en revistas científicas y se mantendrá su identidad estrictamente confidencial.

Su participación es completamente voluntaria y si no desea participar no se afectará su relación con su médico tratante. Si retira su consentimiento para participar, sus muestras de sangre serán eliminadas y la información obtenida acerca de usted no será usada.

Los informes correspondientes a la evolución de su enfermedad y las copias de ciertas partes de su archivo médico (por ejemplo, su historial clínico, resultados de análisis de sangre, biopsias y otros procedimientos médicos y de diagnóstico) podrán ser revisados por los investigadores intervinientes.

FIRMA PARTICIPANTE _____

DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES VOLUNTARIOS

Su participación en este estudio es voluntaria sin recibir presión de ningún tipo por parte de los investigadores o terceros. Usted tiene la libertad de elegir si desea participar o no en el presente estudio. También tiene la libertad de abandonar el estudio en cualquier momento, si así lo desea sin tener que dar explicaciones sobre su decisión. El retirarse del estudio no le representará ninguna penalidad. Su negativa o su retiro de este estudio, será respetada y de ninguna manera afectará su relación con el equipo médico o la realización de su tratamiento.

En caso de **CONSULTAS** acerca de este estudio puede ponerse en contacto con el Dr. Juan Pablo MACKERN al teléfono celular_____. Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación científica, puede llamar al Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo_____, Dr____al teléfono_____.

Esta información otorgada a usted es fundamental para ayudarle a tomar la decisión de participar o no en el presente estudio sin que haya sido forzada ni obligada u obligado a hacerlo. Si usted ha decidido participar del presente estudio por favor lea detenidamente el formulario siguiente y complete con los datos requeridos incluyendo su firma.

FIRMA PARTICIPANTE _____

DECLARACIÓN JURADA DEL PACIENTE INFORMANDO SU CONSENTIMIENTO SOBRE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO TITULADO: "Desarrollo de un nuevo

marcador biológico para enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico basado en el estudio de las diferentes isoformas del receptor de prolactina en Linfocitos"

Yo, el/la que suscribe _____, he sido invitado/a a participar en el proyecto que estudia la función de los linfocitos en enfermos con Lupus Eritematoso Sistémico y Artritis Reumatoide.

Por la presente consiento en participar del estudio titulado: "Desarrollo de un nuevo marcador biológico para enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico basado en el estudio de las diferentes isoformas del receptor de prolactina en Linfocitos", bajo las normas y condiciones definidas en el presente documento, que también suscribo voluntariamente y en ejercicio pleno de mis facultades mentales.

El Dr. _____ me ha suministrado toda la información requerida para comprender las características y riesgos del presente estudio con la posibilidad de responder a todas las inquietudes sobre mis derechos.

Usted entiende que

- ✓ La muestra de sangre se extraerá por punción venosa del brazo.
- ✓ Su participación tiene pocos riesgos, como la aparición de un moretón o molestia en la zona donde se realizó la extracción.
- ✓ No se harán estudios genéticos en las muestras.
- ✓ Las muestras de sangre serán codificadas y sólo el investigador conocerá su nombre. La información obtenida será de uso científico y no será divulgada con otros fines. Esa información podrá ser publicada en revistas científicas y se mantendrá su identidad estrictamente confidencial.

- ✓ No hay costos, ni beneficios económicos para usted.
- ✓ Su participación será un beneficio a futuro para el diagnóstico precoz, tratamiento y seguimiento de estas enfermedades.

- ✓ Su participación es completamente voluntaria y si no desea participar no se afectará su relación con su médico tratante. Si retira su consentimiento para participar, sus muestras de sangre serán eliminadas y la información obtenida acerca de usted no será usada.

Declaro que he recibido una copia de este documento llamado consentimiento informado para leerlo antes de firmar y que se me han explicado los detalles del protocolo.

Este consentimiento se ha dado en forma voluntaria, sin que haya sido forzado/a ni obligado/a hacerlo.

En cualquier momento puedo solicitar al Dr. Juan Pablo Mackern información adicional al siguiente número telefónico: 2615465566.

FIRMA PARTICIPANTE _____

Datos a completar (OBLIGATORIO)

Nombre y apellido del participante:

Fecha de nacimiento:

DNI:

Fecha:

Lugar:

Firma del participante:

Por la presente certifico que el participante__expresa su consentimiento y entiende la naturaleza y propósito del estudio.

Nombre y apellido del testigo:

Fecha de nacimiento:

DNI:

Fecha:

Lugar:

Firma del testigo:

Por la presente certifico que he explicado al participante la naturaleza y propósito de este estudio.

Nombre y apellido del investigador responsable:

Fecha de nacimiento:

DNI:

Fecha:

Lugar:

Firma del investigador responsable:

En este acto se entrega una copia del presente documento firmado al participante, investigador responsable y testigo.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador responsable

Lugar y fecha:

Lugar y fecha:

Nombre y firma de un testigo

Lugar y fecha:

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO

Por medio de la presente dejo constancia que revoco el consentimiento informado arriba prestado y en consecuencia me niego a seguir participando del proyecto que estudia la función de los linfocitos T en enfermos de Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico.

FIRMA PARTICIPANTE _____

FIRMA DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE _____