



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**



Posgrado en  
Biología Experimental

---

**SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS T FOLICULARES Y  
B DE CENTRO GERMINAL EN RATONES MRL/lpr.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**Biól. Exp. Paola Santana Sánchez**  
Matricula: 2193801662

**CODIRECTORA INTERNA: Dra. Ma. Del Socorro Retana Márquez**  
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

**CODIRECTORA EXTERNA: Dra. Adriana Karina Chávez Rueda**  
UIM en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, CMNSXXI, IMSS

**ASESOR: Dr. Julio César Almanza Pérez**  
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

**Ciudad de México, CDMX, Octubre del 2022**

**El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo de este Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.**

La estudiante contó con el apoyo del Programa de Becas Nacionales de CONACYT,

CVU: 1008892.

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la dirección académica de la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda y la coordinación académica de la Dra. María del Socorro Retana Márquez de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El proyecto contó con el financiamiento de CONACyT A1-S-9789.

El proyecto fue aprobado por la Comisión de Ética y Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro R-2021-3603-029.

El mantenimiento de los animales de estudio se llevó a cabo en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedad Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” a cargo del MVZ Alberto Pizaña Venegas y en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI a cargo de la M.C. Itzel Isaura Baca Ibarra.

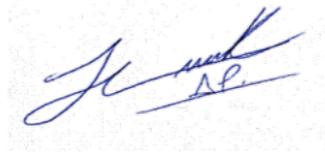
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

**SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS T FOLICULARES Y B DE CENTRO GERMINAL EN RATONES MRL/lpr, que presentó**

**Paola Santana Sánchez**

Sinodales:

Dr. Julio César Almanza Pérez.  
Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I  
e-mail: [jcap@xanum.uam.mx](mailto:jcap@xanum.uam.mx)  
**Presidente**



Dra. Beatriz Gómez González  
Biología de la Reproducción.  
Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I  
e-mail: [bgomez@xanum.uam.mx](mailto:bgomez@xanum.uam.mx)  
**Secretario**



Dra. Roxana Uri Miranda Labra.  
Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I  
e-mail: [roxml@xanum.uam.mx](mailto:roxml@xanum.uam.mx)  
**Vocal 1**



Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá.  
Unidad de Investigación en Virología y Cáncer.  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.  
e-mail: [empanana@yahoo.com](mailto:empanana@yahoo.com)  
**Vocal 2**

*EZEQUIEL M. FUENTES*

## Declaración de originalidad

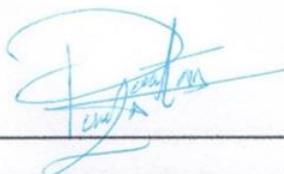
La que suscribe **Paola Santana Sánchez**, alumna del posgrado en **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS T FOLICULARES Y B DE CENTRO GERMINAL EN RATONES MRL/lpr**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **Maestra en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **26 de Mayo del 2022**.

Atentamente



---

**Paola Santana Sánchez**

*Las enfermedades complejas se deben a la conjugación de malos genes, un individuo susceptible y la mala suerte*

*Meda et al., 2011*

## **Dedicatorias**

*Con todo mi amor a,*

*Mis padres, que siempre me han amado, apoyado & motivado incondicionalmente, que me han comprendido cuando he tenido que ausentarme y que nunca han dudado de mi capacidad aún en mis días grises. Que han soportado lágrimas y risas, incluso a altas horas de la noche. Ellos son los responsables de que busque sacar mi mejor versión como persona en el día a día.*

*A mi hermana Brenda por ser un ejemplo de vida, por escucharme y acompañarme siempre en mi formación académica.*

*A mi hermano Gaby, mi cuñada y sobrinos que se alegran de mis procesos académicos y me otorgan una agradable compañía.*

*A mis siempre fieles docky, búster, balto, bobby, balú, shaggy & dólar. Agradezco inmensamente su compañía.*

*¡Gracias a todos por potenciar mi felicidad y animarme a perseguir mis sueños!*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Karina, que me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por creer en mí y por motivarme a continuar mi formación académica, aún con el poco interés y apoyo económico que se le otorga a esta área científica.*

*Al M.C. Ricardo, que me ayudó incondicionalmente y por brindarme su excelente compañerismo que hizo más amena la estancia en el laboratorio.*

*Al Q.F.B Enrique, que se convirtió en un gran compañero de laboratorio, amigo y confidente. Agradezco inmensamente su amistad, motivación y apoyo.*

*A los miembros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, especialmente a la Dra. Vicky, por sus enseñanzas y consejos académicos.*

*A la Dra. Socorro por aceptar formar parte de mi comité académico y por su apoyo a pesar de las adversidades que he enfrentado.*

*Al Dr. Julio por confiar en mí, por sus consejos, motivación y apoyo a lo largo de este complicado periodo y por aceptar formar parte de mi comité académico.*

*A los miembros de mi Jurado por sus valiosas opiniones y consejos académicos. Agradezco a la Dra. Betty por la importancia que le otorgó a mi proyecto.*

*A mis compañeros y amigos, en especial a Michel, Jacqueline, Zacbé, Rosario, David y Gustavo, que sin ellos este proceso no habría sido el mismo y que sé que toman mis logros como parte de ellos. Que siempre me impulsaron a buscar el lado divertido y bueno de la vida y sobre todo a cerrar este importante ciclo. Siempre les agradeceré su motivación y apoyo.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
Índice de figuras.....	viii
Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
Introducción .....	1
Desarrollo y maduración de linfocitos T y B.....	1
Centros germinales.....	4
Linfocitos T foliculares (Tfh) y B de centro germinal (B-GC).....	6
Lupus eritematoso sistémico y sistema inmune .....	8
Modelos de ratón de LES.....	9
Prolactina y su receptor .....	9
Antecedentes.....	12
Prolactina y Lupus Eritematoso Sistémico .....	12
Justificación.....	13
Planteamiento del problema.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
Diagrama experimental.....	16
Materiales y Métodos .....	17
Resultados.....	23
Discusión.....	41
Conclusiones.....	47
Perspectivas.....	48
Referencias.....	48
<b>ANEXO I: <u>Revisión Bibliográfica aceptada</u></b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO II: <u>Artículo experimental aceptado</u></b> .....	<b>54</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Desarrollo y maduración de linfocitos T	2
<b>Figura 2.</b> Desarrollo y maduración de linfocitos B	4
<b>Figura 3.</b> Arquitectura de un centro germinal	6
<b>Figura 4</b> Interacción de linfocitos Tfh y B-GC	7
<b>Figura 5</b> Estructura de la PRL humana	9
<b>Figura 6</b> Isoformas del R-PRL de ratón	10
<b>Figura 7</b> Señalización de las isoformas del R-PRL	11
<b>Figura 8</b> Estrategia experimental	16
<b>Figura 9</b> Proliferación de la línea celular Nb2-11 inducida por PRL	23
<b>Figura 10</b> Estrategia de análisis utilizada en linfocitos Tfh	24
<b>Figura 11</b> La PRL incrementa el porcentaje de linfocitos Tfh pSTAT3+	25
<b>Figura 12</b> La PRL incrementa la IMF de pSTAT3 en linfocitos Tfh	26
<b>Figura 13</b> La PRL no incrementa pSTAT1, pSTAT5 y pAKT en linfocitos Tfh	26
<b>Figura 14</b> Expresión relativa de las isoformas del R-PRL de los linfocitos B-GC diferenciados <i>in vitro</i>	27
<b>Figura 15</b> Estrategia de análisis en linfocitos B-GC diferenciados <i>in vitro</i>	28
<b>Figura 16</b> La PRL incrementa la fosforilación de STAT1 en los linfocitos B-GC	29
<b>Figura 17</b> Fosforilación de STAT3 en linfocitos B-GC	30
<b>Figura 18</b> Fosforilación de STAT5 en linfocitos B-GC	31
<b>Figura 19</b> Fosforilación de ERK en linfocitos B-GC	32
<b>Figura 20</b> Fosforilación de AKT en linfocitos B-GC	33
<b>Figura 21</b> Estrategia de análisis para identificar linfocitos que no son B-GC	34
<b>Figura 22</b> Fosforilación de STAT1 en linfocitos que no son B-GC	35

<b>Figura 23</b>	Fosforilación de STAT3 en linfocitos que no son B-GC	35
<b>Figura 24</b>	Fosforilación de STAT5 en linfocitos que no son B-GC	36
<b>Figura 25</b>	Fosforilación de ERK en linfocitos que no son B-GC	36
<b>Figura 26</b>	Fosforilación de AKT en linfocitos que no son B-GC	36
<b>Figura 27</b>	Expresión relativa de Birc5 y c-myc modulada por PRL después de la diferenciación a linfocitos B-GC	37
<b>Figura 28</b>	Expresión relativa de Birc5 y c-myc modulada por PRL durante la diferenciación de los linfocitos B-GC	38
<b>Figura 29</b>	Cuantificación de la PRL producida por los linfocitos B-GC	39
<b>Figura 30</b>	Producción de PRL en los linfocitos B-GC	40
<b>Figura 31</b>	Efecto de la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC diferenciados <i>in vitro</i> de ratones MRL/lpr	46

## ABREVIATURAS

---

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AKT (PKB)</b>	Proteína cinasa B (protein kinase B)
<b>APC</b>	Células Presentadoras de Antígeno (antigen-presenting cell)
<b>BAFF</b>	Factor de activación de linfocitos B (B cell activating factor belonging to the TNF family)
<b>B-GC</b>	Linfocito B de centro germinal (germinal center B lymphocyte)
<b>B-CL6</b>	Proteína 6 del linfoma de células B (B-cell lymphoma 6)
<b>BCR</b>	Receptor de linfocitos B (B cell receptor)
<b>B-FO</b>	Linfocitos B Foliculares
<b>Birc5</b>	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing five
<b>B-ZM</b>	Linfocito B de zona marginal
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
<b>CD</b>	Molécula de diferenciación (cluster of differentiation)
<b>CD40-L</b>	Ligando de CD40
<b>CG</b>	Centro germinal
<b>CRC</b>	Células reticulares
<b>CXCL</b>	Ligando de quimiocina (motivo CXC)
<b>DZ</b>	Zona oscura
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético (ethylenediaminetetracetic acid)
<b>FDC</b>	Células dendríticas foliculares (follicular dendritic cell)
<b>FSC</b>	Parámetro de tamaño o de dispersión frontal (foward scatter)
<b>HSC</b>	Células troncales hematopoyéticas (hematopoietic stem cells)

<b>HSM</b>	Hipermutación somática
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IgH</b>	Cadena pesada de la inmunoglobulina
<b>IgL</b>	Cadena ligera de la inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>IRF4</b>	Factor 4 regulador del interferón
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LZ</b>	Zona clara
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein)
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3 cinasa (phosphoinositide 3 kinase)
<b>Pre-B</b>	Células B precursoras
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>Pro-B</b>	Células progenitoras B
<b>pSTAT</b>	STAT fosforilado
<b>R-PRL</b>	Receptor de prolactina
<b>SSC</b>	Parámetro de complejidad o de dispersión lateral (side scatter)
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de transcripción (signal transducer and activator of transcription)
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T
<b>Tfh</b>	Linfocitos T cooperadores foliculares
<b>Tfr</b>	Linfocitos T foliculares reguladores
<b>Tregs</b>	Linfocitos T reguladores

## RESUMEN

---

Las alteraciones en el sistema inmune-neuroendocrino contribuyen al desarrollo de autoinmunidad. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial, caracterizada por defectos en la respuesta inmune. El LES afecta predominantemente al sexo femenino en etapa reproductiva, por lo cual se le ha asociado con las hormonas, como la prolactina (PRL). Se ha demostrado en modelos de ratón y en pacientes con LES, niveles incrementados de PRL sérica que se ha asociado con el LES activo e inactivo. En ratón se han descrito cuatro isoformas del receptor de PRL (R-PRL), una larga y tres cortas, la unión del receptor con la PRL provoca un cambio conformacional que induce la dimerización del receptor, desencadenando su señalización a través de las vías JAK-STAT, MAPK y/o PI3K-AKT. En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que los linfocitos T foliculares (Tfh) y B de centro germinal (B-GC) de ratones MRL/lpr que desarrollan LES, expresan la isoforma larga del receptor de PRL. Asimismo, se ha reportado que la PRL es capaz de inducir la proliferación de los linfocitos B-GC y su diferenciación a células productoras de anticuerpos. Sin embargo, se desconoce la señalización de PRL en ambos tipos celulares, por lo que en el presente trabajo se evaluó la vía de señalización de la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC diferenciados *in vitro*, así como la expresión de c-myc y Birc5 involucrados en la proliferación del linfocito B-GC. Para ello se utilizaron linfocitos T naive y B, de ratones MRL/lpr que desarrollan manifestaciones similares al LES y de ratones de la cepa control C57BL/6. La señalización se evaluó a través de citometría de flujo y la expresión génica se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos sugieren que la PRL señala a través de STAT3 en los linfocitos Tfh y por STAT1 y en menor medida por AKT en los linfocitos B-GC de ratones que desarrollan LES respecto a la cepa control y a los linfocitos que solo se incubaron con medio. La fosforilación de STAT3 se vio revertida cuando los linfocitos se pre-incubaron con el inhibidor de pSTAT3. Además, los linfocitos B-GC son capaces de producir PRL. Sin embargo, la PRL no incrementó la expresión de c-myc y Birc5 en los linfocitos B-GC por lo que será importante la identificación de nuevos candidatos involucrados en los mecanismos celulares y moleculares que nos ayuden a comprender la proliferación de los linfocitos B-GC y su diferenciación hacia células productoras de anticuerpos.

## ABSTRACT

---

Alterations in the immune-neuroendocrine system contribute to the development of autoimmunity. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial autoimmune disease, characterized by defects in the immune response. SLE affects females in the reproductive stage, so that it is related to hormones, as prolactin (PRL). Increased levels of serum PRL have shown in mouse models and in SLE patients and have been associated with active and inactive SLE. In mice, four isoforms of the PRL receptor are describe, one long and three shorts, in which the ligand binding induces receptor dimerization, triggering the signaling pathways through the JAK-STAT, MAPK and/or PI3K-AKT. In our working group, it has been determined that the follicular T lymphocytes (Tfh) and germinal center B lymphocytes (B-GC) of MRL/lpr mice that develop SLE express the long isoform of PRL receptor. Equally, it has reported that PRL can induce the proliferation of B-GC lymphocytes and their differentiation into antibody secreting cells. However, PRL signaling in both cell types is unknown, so in the present work the effect of PRL on the signaling of differentiated Tfh and B-GC lymphocytes *in vitro* was evaluated, as well as the expression of c-myc and Birc5 that can induce the proliferation of B-GC lymphocytes. Naive T and B lymphocytes were obtained from MRL/lpr mice, which develop SLE, and from C57BL/6 mice. Signaling was evaluate using flow cytometric techniques, while real-time RT-PCR was performed for gene expression. PRL signals through STAT3 in the Tfh lymphocytes and through STAT1 and to a lesser extent through AKT in the B-GC lymphocytes of MRL/lpr mice with respect to the control strain and the lymphocytes that were only incubated with medium. STAT3 phosphorylation was reversed when lymphocytes were preincubated with the inhibitor of pSTAT3. Furthermore, B-GC lymphocytes can produce PRL. However, PRL does not increase the expression of c-myc and Birc5 in B-GC lymphocytes. So, it will be important to identify new candidates involved in cellular and molecular mechanisms that will help us understand the proliferation of lymphocytes B-GC and the differentiation to antibody secreting cells.

## INTRODUCCIÓN

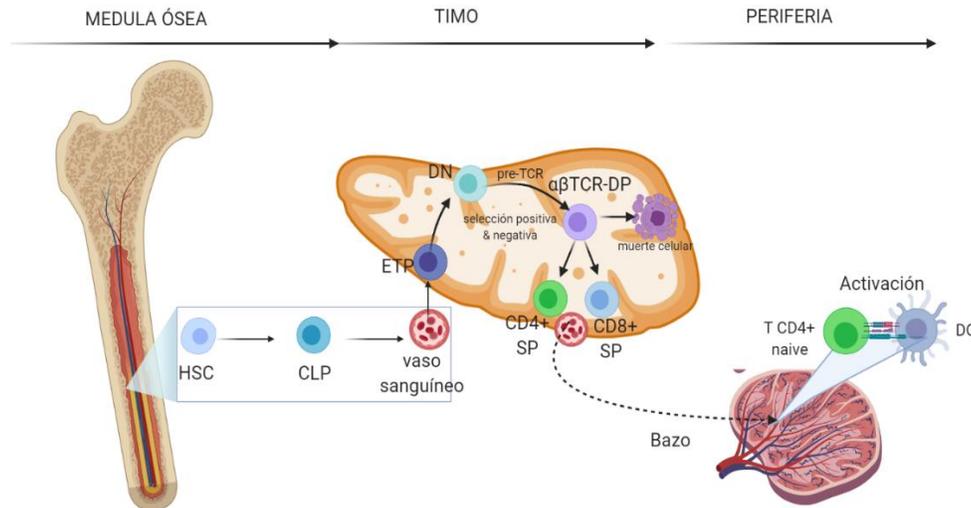
---

### Desarrollo y maduración de linfocitos T y B

La ontogenia de linfocitos T y B, inicia en la médula ósea a partir de progenitores linfoides tempranos que derivan de células troncales hematopoyéticas (HSC), durante un proceso regulado y continuo donde se pierden gradualmente los potenciales de diferenciación múltiple y se adquieren funciones especializadas de linaje, hasta llegar a un progenitor linfoide común (CLP), que da lugar a linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés Natural Killer) (Owen et al., 2020).

El desarrollo de los linfocitos T ocurre en el Timo, comienza con la llegada por vía sanguínea de pequeñas cantidades de los precursores de los timocitos, también llamados precursores asentados en el Timo (TSP), los cuales se van a diferenciar en la población más inmadura de timocitos que son los progenitores tímicos tempranos (ETP). Posteriormente, los timocitos dobles negativos (DN) que no expresan en su superficie CD4 y CD8 pasan por una serie de etapas de desarrollo en las que se comprometen con el linaje de linfocitos T y reorganizan los *loci* génicos del receptor de linfocitos T (TCR). Los timocitos que reorganizan adecuadamente la cadena  $\beta$  del TCR proliferan, inician la reorganización de las cadenas  $\alpha$  y dan lugar a timocitos dobles positivos (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, que llevarán a cabo la selección positiva y negativa. Aquellos timocitos DP, cuyo receptor (TCR) reconoce al complejo compuesto por el péptido y el MHC (pMHC) con afinidad baja e intermedia se seleccionan positivamente y maduran a linfocitos T simples positivos (SP) que saldrán del timo como linfocitos T naive CD4<sup>+</sup> (cooperadores; T<sub>H</sub>) o CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). Los linfocitos T naive pueden ser activados por el reconocimiento de algún antígeno específico en órganos linfoides secundarios, como el bazo o los ganglios linfáticos (Fig.1) (Cano & Lopera, 2013; Overgaard et al., 2015; Owen et al., 2020).

El reconocimiento del antígeno ocurre a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) (Saravia et al., 2019). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive activados se diferencian a distintas subpoblaciones especializadas, de acuerdo con el microambiente de citocinas, cascadas de señalización y factores de transcripción específicos. Dentro de los linajes de linfocitos más descritos se encuentran los TH1, TH2, TH17, T reguladores (Treg), y los linfocitos T foliculares (Tfh) (Saravia et al., 2019).



**Fig.1.- Desarrollo y maduración de linfocitos T.** El desarrollo del linfocito T inicia en el timo a través de precursores hematopoyéticos que se diferencian en timocitos DN. Los timocitos DN se diferencian a timocitos DP que llevarán a cabo la selección positiva y negativa. Finalmente, los timocitos maduran a linfocitos T SP y salen del timo como linfocitos T naive. Las abreviaturas corresponden a HSC: célula madre hematopoyética; CLP: progenitores linfoides comunes; ETP: progenitores tímicos tempranos; DC: células dendríticas; DN: timocitos dobles negativos; SP: linfocitos simples positivos. Creado con BioRender.com

Por otra parte, los CLP, destinados a convertirse en linfocitos B, permanecen en la médula ósea. Durante el proceso de compromiso hacia el linaje y maduración se requiere de la participación de los factores de transcripción E2A, EBF, Pax5, PU.1, e Ikaros, así como de la señalización de IL-7, el factor de células primordiales (SCF) y CXCL12 (Glimcher & Singh, 1999; Sigvardsson, 2018). Las diferentes etapas de desarrollo de los linfocitos B se dan de acuerdo con el reordenamiento de genes de las inmunoglobulinas (Igs) que forman el receptor de células B (BCR). La Ig's están formadas por una cadena pesada (IgH) y una cadena ligera (IgL). Ambas cadenas están formadas por regiones variables y constantes; la región variable de IgH está formada por los segmentos génicos VDJ, mientras que la IgL se genera a partir de los segmentos VJ, mediado por las enzimas RAG1/2 (Owen et al., 2020; Pieper et al., 2013). Los estadios de diferenciación de los linfocitos B se pueden diferenciar por la expresión de su fenotipo (Owen et al., 2020).

Las primeras etapas de maduración de los linfocitos B se dan en la médula ósea. El CLP da lugar a las células pro-B ( $B220^+CD93^+IgM^-CD43^+CD19^+CD10^+$ ), la etapa de compromiso definitivo es controlada principalmente por el gen Pax5 y EBF1; en este estadio se re-arreglan los segmentos D-J de la cadena IgH y posteriormente el segmento V-DJ, dando lugar a un re-arreglo funcional VDJ; también se expresan los genes que codifican para V preB y  $\lambda 5$  que en conjunto comprenden la cadena ligera sustituta (SLC) (Abbas et al., 2015; Sigvardsson, 2018).

Posteriormente, en la etapa de linfocitos pre-B (B220<sup>low</sup>CD93<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), dos SLC se alinean con dos cadenas pesadas  $\mu$ , formando el receptor de linfocitos pre-B (pre-BCR). Los linfocitos pre-B reorganizan los segmentos de los genes que codifican las cadenas  $\kappa$  y  $\lambda$  de la cadena ligera, en conjunto con la cadena  $\mu$  forman una inmunoglobulina tipo M (IgM) de superficie, dando lugar a la etapa de linfocitos B inmaduros (B220<sup>+</sup>CD93<sup>+</sup>IgM<sup>low</sup>CD43<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) (Aurrand-Lions & Mancini, 2018; Owen et al., 2020; Pieper et al., 2013).

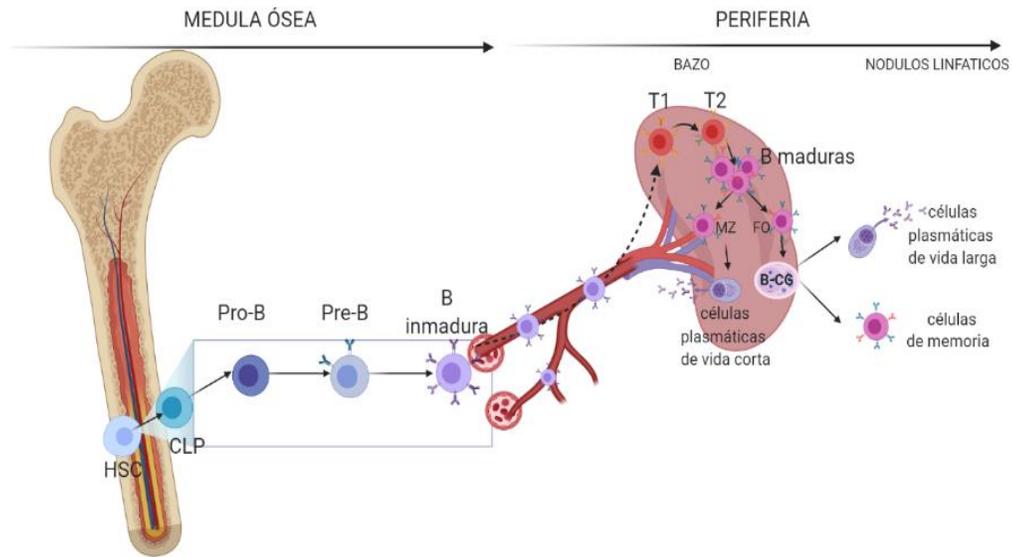
Los linfocitos B inmaduros abandonan la médula ósea una vez que se expresa el receptor que reconoce el 1-fosfato de esfingosina (S1P-R), llegan al bazo para completar su maduración y pasan por linfocitos B de transición T1 (IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup> CD24<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> CD21<sup>-</sup> CD23<sup>-</sup> BAFF-R<sup>+/-</sup>) y T2 (IgM<sup>high</sup> IgD<sup>intermedio</sup> CD24<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> BAFF-R<sup>+</sup>), en donde BAFF-R les envía señales de supervivencia, como la activación de factores anti-apoptóticos y de proliferación, para que culminen su proceso como linfocitos B maduros (Abbas et al., 2015; Kenneth Murphy et al., 2009). Aquellos linfocitos B que se encuentran en la zona marginal del bazo se denominan linfocitos B de zona marginal (B-ZM; CD19<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup> CD1<sup>+</sup>), mientras que los que se localizan en los folículos son conocidos como linfocitos B foliculares (B-FO; CD19<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> IgM<sup>low</sup> IgD<sup>high</sup> CD23<sup>+</sup>) (Fig.2).

Los linfocitos B maduros recirculan en la sangre y en órganos periféricos hasta que llegan a ser activados. Los linfocitos B activados pueden optar por 1) llegar a sitios extrafoliculares, proliferar y diferenciarse en células plasmáticas de vida corta que secretan anticuerpos, o 2) llegar hacia folículos de linfocitos B, proliferar y generar el CG. Se sugiere que la decisión toma en cuenta la afinidad del BCR por el antígeno (Ag), la cantidad de interacción Ag-receptor y las señales coestimuladoras recibidas de los linfocitos T (Abbas et al., 2015; Allen et al., 2007).

Los linfocitos B-FO, tienen la capacidad de responder al encuentro con antígenos de manera dependiente de células T<sub>fh</sub> en el centro germinal y ahí diferenciarse a células B de memoria o células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los linfocitos B-ZM, en cambio, pueden reconocer Ag T independientes, que son transportados por la sangre y se pueden diferenciar a células plasmáticas de vida corta secretoras de IgM de baja afinidad, o bien, iniciar una respuesta a Ag de manera dependiente de linfocitos T (Abbas et al., 2015; Pieper et al., 2013).

Cabe mencionar que la supervivencia, la maduración y la diferenciación de linfocitos B depende de un microambiente de citocinas. Ejemplo de ello son el factor de activación de los

linfocitos B (BAFF) y la interleucina 21 (IL-21), los cuales inducen la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. La interleucina 6 (IL-6) también juega un papel en el desarrollo y mantenimiento del CG (Yap & Chan, 2019).



**Fig.2.- Desarrollo y maduración de linfocitos B.** El desarrollo del linfocito B inicia en médula ósea a través de precusores hematopoyéticos que posteriormente se diferencian en linfocitos Pro-B, Pre-B e inmaduros. Los linfocitos inmaduros cuando salen de médula ósea y llegan al bazo son llamados Transitorios 1, que se diferencian a Transitorios 2 y completan su maduración hacia linfocitos B-FO o B- ZM.

HSC: célula madre hematopoyética; CLP: progenitores linfoides comunes; pro-B: células progenitoras B; pre-B: células B precursoras; B-ZM: linfocitos B de zona marginal; B-FO: linfocitos B foliculares. Creado con BioRender.com

## Centros germinales

Anatómicamente, todos los órganos linfoides secundarios como el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas, tienen regiones específicas donde se encuentran los linfocitos T y B (Pieper et al., 2013). Los linfocitos B naive se encuentran en los folículos y cuando se activan, pueden iniciar la formación de zonas centrales llamadas centros germinales (CG); a estos folículos se les conoce como folículos secundarios, mientras que los folículos sin centros germinales se llaman folículos primarios (Abbas et al., 2015).

Por otra parte, la zona donde se encuentran los linfocitos T se localiza por debajo de los folículos en los cordones paracorticales, comúnmente llamada corteza parafolicular. Los linfocitos T naive entran a la zona de linfocitos T a través de un conjunto de vénulas del endotelio alto, conformado por vasos sanguíneos corticales, alrededor del 70 % de los linfocitos T corticales son linfocitos T CD4+ cooperadores (Abbas et al., 2015; Owen et al., 2020).

La residencia de linfocitos T y B en sus zonas específicas, se determina a través de gradientes de quimiocinas, ya que los linfocitos T naive expresan el receptor de quimiocina CCR7 que se unirá a las quimiocinas CCL19 y CCL21 producidas por células estromales en las zonas de linfocitos T. Las células dendríticas (CD), que previamente han sido activadas por patógenos, también expresan CCR7, motivo por el cual pueden llegar a órganos secundarios periféricos, dirigirse a la zona de linfocitos T y activarlos; mientras que, los linfocitos B expresan CXCR5, que se une al ligando CXCL13, quimiocina producida solo en los folículos por las células dendríticas foliculares (FDC) (Kenneth Murphy et al., 2009; Owen et al., 2020).

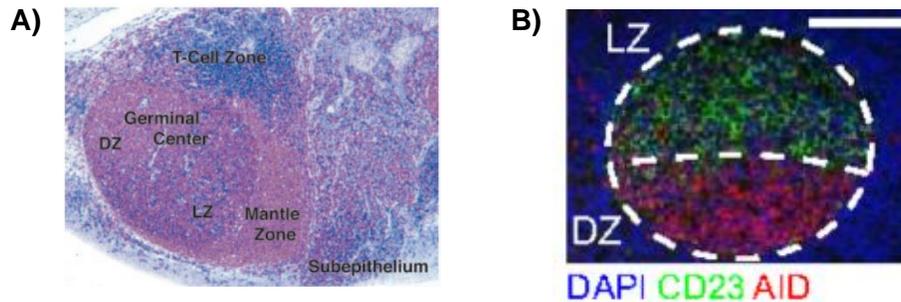
Es por ello que los CGs, se pueden definir como microestructuras de proliferación de linfocitos B en los folículos de los tejidos linfoides secundarios, que se desarrollan ante una estimulación antigénica dependiente de linfocitos T y donde se producen las células plasmáticas secretoras de anticuerpos de larga duración y linfocitos B de memoria que proporcionan protección contra una reinfección (Klein & Dalla-Favera, 2008; Pieper et al., 2013; Stebegg et al., 2018).

En el CG los linfocitos B llevan a cabo dos procesos: 1) hipermutación somática (HSM), mutaciones puntuales que se suscitan en linfocitos B maduros en los sitios hipervariables de los genes  $V_H$  y  $V_L$  que codifican la región variable de la inmunoglobulina (IgV), y 2) la recombinación de cambio de clase de inmunoglobulina. Ambos mecanismos tienen el fin de generar linfocitos B que reconozcan a su antígeno con alta afinidad a través de su BCR, estos linfocitos B proliferarán y se diferenciarán en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas (Pieper et al., 2013; Stebegg et al., 2018; Yap & Chan, 2019).

El CG maduro puede dividirse en dos compartimentos, una zona oscura (DZ) y una zona clara (LZ) (Mesin et al., 2016). La DZ contiene células reticulares (CRC) productoras de CXCL12 (Stebegg et al., 2018). Además, en la DZ se encuentran los linfocitos B en proliferación, conocidos como “centroblastos”. Los centroblastos tienen una alta expresión de CXCR4, de los factores de transcripción (FOX1 y Bcl6) y de citidina desaminasa (AID), la cual es capaz de impulsar la HSM en esta zona. En la DZ se estarían generando variantes clonales con diversas afinidades por el Ag (Mesin et al., 2016; Song & Matthias, 2018).

Una vez que los centroblastos dejan de proliferar y salen de la DZ al seguir un gradiente de CXCL13, llegan a la LZ como “centrocitos”. En la LZ se seleccionarán a los linfocitos B con mayor afinidad al Ag e iniciarán su diferenciación a células plasmáticas o de memoria. En general, en la LZ se encuentran linfocitos B de centro germinal (B-GC), células dendríticas

foliculares (CDF), linfocitos T foliculares (Tfh), una pequeña población de T foliculares reguladores (Tfr) y algunos linfocitos B naive que se infiltran (Mesin et al., 2016; Song & Matthias, 2018; Stebegg et al., 2018).



**Fig.3.- Arquitectura de un centro germinal.** Secciones de tejido de ganglios linfáticos humanos conservados en parafina. A) Análisis inmunohistoquímico en el que se identifica el centro germinal con la región oscura y clara y la zona de linfocitos T B) Tinción de inmunofluorescencia en el que se observa la distribución anatómica del centro germinal a través de la presencia de anticuerpos dirigidos hacia CD23 (verde) que identifica la zona clara y AID (rojo) que identifica indirectamente la zona oscura; los núcleos se observan en tonalidad azul. LZ: Zona Clara; DZ: Zona Oscura; AID: Citidina Desaminasa (modificado de Klein et al., 2003; Victora et al., 2012).

### Linfocitos T foliculares (Tfh) y B de centro germinal (B-GC)

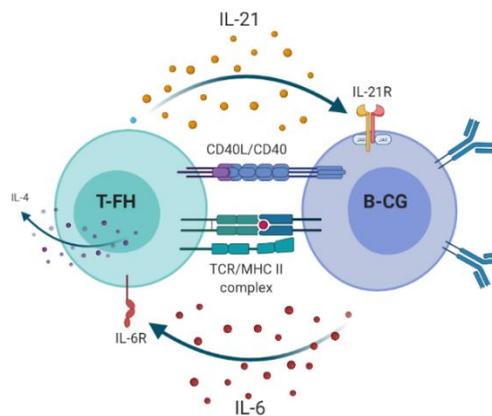
Los linfocitos Tfh se diferencian a partir de un linfocito T naive, el cual se activa cuando a través de su TCR reconoce a su Ag presentado en el contexto del MHC-II. La diferenciación hacia linfocitos Tfh requiere de IL-6, IL-23 e IL-21, que inducen la activación de STAT3 y la expresión del factor de transcripción maestro, denominado B-CL6 (Saravia et al., 2019; Kim et al., 2018). Los Tfh presentan el fenotipo CD4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup> (receptor de quimiocina CXC tipo 5), CD40-L (ligando de CD40), con la coexpresión de ICOS (estimulador inducible de células T) y la proteína PD-1 (muerte celular programada-1) (Crotty, 2014).

Los linfocitos Tfh promueven la inmunidad humoral dentro de los centros germinales (Stebegg et al., 2018). Los Tfh modulan la selección, supervivencia y maduración de clonas de los linfocitos B-GC en el CG, por lo cual inducen indirectamente la formación de estas microestructuras (Crotty, 2014; Kim et al., 2018). Una alta expresión de CXCR5 regula negativamente al receptor quimiotáctico primario para la zona T (CCR7), promoviendo la migración de los Tfh al borde del folículo de los linfocitos B. Los Tfh inducen la expresión de Bcl6 en linfocitos B activados para iniciar la diferenciación de linfocitos B-GC; mientras que, la interacción de ICOS con su ligando en linfocitos B promueve la interacción T:B (Crotty, 2014). También, los Tfh proporcionan señales de CD40L para la activación, proliferación y

diferenciación de linfocitos B hacia el centro germinal y sitios extrafoliculares. (Saravia et al., 2019;Crotty, 2019; Zhang & Vignali, 2016).

En el centro germinal, los linfocitos Tfh facilitan el desarrollo y la maduración de la afinidad del receptor de linfocitos B (BCR), para evitar el reconocimiento de moléculas propias (Crotty, 2014). Es así que los Tfh garantizan el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, con lo que se mantiene la homeostasis en los puntos de control que aseguran la eliminación de células autorreactivas y con ello se promueve una respuesta inmune adecuada (Waldmann, 2014).

Además, los Tfh secretan la citocina IL-21, que induce proliferación y diferenciación a células plasmáticas, e IL-4, que está involucrada con el cambio de clase de inmunoglobulina de los linfocitos B-GC (Saravia et al., 2019;Crotty, 2019; Zhang & Vignali, 2016). A la vez que los B-GC secretan interleucina 6 (IL-6) para promover la diferenciación de los linfocitos Tfh, la formación del centro germinal y la producción de anticuerpos. Además, la interacción de receptores coestimuladores de superficie de linfocitos B, con sus ligandos expresados por células Tfh, como el ya mencionado CD40 y su ligando CD40 (CD154), también son importantes en la formación de los CG (Allen et al., 2007; Yap & Chan, 2019). Existiendo una clara retroalimentación entre ambos tipos celulares para el mantenimiento temprano y tardío del CG (Yap & Chan, 2019).



**Fig.4.- Interacción de linfocitos Tfh y B-GC.** La interacción de los linfocitos Tfh hacia los linfocitos B-GC induce la activación y diferenciación de estos últimos para promover una respuesta inmune adecuada. Se requiere la participación de moléculas coestimuladoras en los linfocitos Tfh que interactúen con sus ligandos en los linfocitos B y de la secreción de citocinas para la maduración, diferenciación y/o mantenimiento de los centros germinales (Allen et al., 2007; Yap & Chan, 2019;Crotty, 2019). Creado con BioRender.com

## **Lupus Eritematoso Sistémico y Sistema Inmune**

La diferenciación y activación de linfocitos Tfh y B-GC autorreactivos (células capaces de reconocer antígenos propios) impulsan la generación de autoanticuerpos y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, entre las que se encuentra el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Zhang & Vignali, 2016). El LES es una enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación crónica (Rees et al., 2017). Afecta con mayor frecuencia a mujeres que a hombres en una relación 9:1 (Lisnevskaja et al., 2014) entre la pubertad y la menopausia (Fatoye et al., 2018). Este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas sexuales, como la prolactina (PRL). Las diversas manifestaciones clínicas del LES incluyen erupción cutánea, trombocitopenia, serositis, nefritis, entre otras (Manson & Rahman, 2006). Se desconoce su etiología, pero las diversas manifestaciones clínicas corresponden con la predisposición por factores genéticos (HLA-B8, HLA-DR3, deficiencias de componentes del complemento como C1q o C4, etc.), que en conjunto con factores ambientales como la inflamación por tabaquismo o la activación del sistema inmune innato por el virus de Epstein-Barr, pueden desencadenar la enfermedad, resultando en una desregulación del sistema inmunológico (Kaul et al., 2016).

Los pacientes con LES presentan defectos en los mecanismos de tolerancia (Maidhof & Hilar, 2012), dando lugar a la aparición de clonas autorreactivas de linfocitos T y B (Kim et al., 2018). En el LES existe una hiperactividad de linfocitos B que conduce a la producción de autoanticuerpos dirigidos contra componentes nucleares. Tales componentes pueden ocurrir por una eliminación inapropiada de células apoptóticas y son reconocidos como antígenos, dando como resultado la formación de complejos inmunes que se depositan en diversos órganos provocando inflamación y daño tisular (Maidhof & Hilar, 2012).

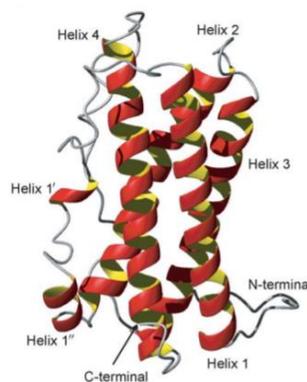
En el LES se han reportado defectos en la señalización temprana e intermedia de los linfocitos T y B (Lisnevskaja et al., 2014; Yap & Chan, 2019). Los linfocitos presentan defectos de proliferación, producción de citocinas y sus funciones reguladoras de activación y coestimulación se ven alteradas. En los linfocitos T la expresión prolongada de la molécula de coestimulación CD40 ligando (CD40L), incrementa la activación y diferenciación de linfocitos B, implicando una disfunción celular (Kaul et al., 2016). Además, existe una correlación entre el incremento de linfocitos Tfh y la actividad del LES (Kim et al., 2018).

## Modelos de ratón de LES

Debido a la variedad de síntomas que presenta el LES, se han desarrollado modelos animales para la mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad. Uno de los modelos más usados son los ratones provenientes de la primera generación de la cruce entre las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW), conocidos como NZB/NZW F1, los cuales desarrollan un síndrome similar a lupus, caracterizado por linfadenopatía, esplenomegalia, títulos elevados de anticuerpos antinucleares y glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos. Generalmente es utilizado para estudios genéticos y respuestas a fármacos. Por otro lado, los ratones MRL derivan de múltiples cruces de cepas consanguíneas LG/J, C3H/Di, C57BL/6 y AKR/J. Una mutación espontánea en el gen *Fas* ocurrida durante la endogamia causó linfoproliferación (fenotipo *lpr*), generando la cepa MRL/*lpr*. Estos animales demostraron hiperactividad de los linfocitos B, complejos inmunes circulantes, hiperplasia linfoide y glomerulonefritis. En estos modelos se ha probado la participación de la PRL en la patogénesis de LES (Li et al., 2017; McMurray, 2001).

## Prolactina y su receptor

La PRL es una hormona polipeptídica con tres enlaces disulfuro entre seis residuos de cisteína (Cys<sup>4</sup>-Cys<sup>11</sup>, Cys<sup>58</sup>-Cys<sup>174</sup>, and Cys<sup>191</sup>-Cys<sup>199</sup>). La PRL humana es codificada por el cromosoma 6, su gen tiene un tamaño de 10 kb y se encuentra conformado por 5 exones y 4 intrones. En su estructura secundaria cuenta con 4  $\alpha$  hélices largas dispuestas en forma antiparalela. La isoforma monomérica tiene un peso de 23-kDa y está compuesta por 199 aminoácidos. La PRL contiene dos sitios de unión, el sitio 1 que incluye las hélices 1 y 4, y el sitio de unión 2 que involucra las hélices 1 y 3 (Fig.5) (Freeman et al., 2000; Jara et al., 2017; Teilum et al., 2005).

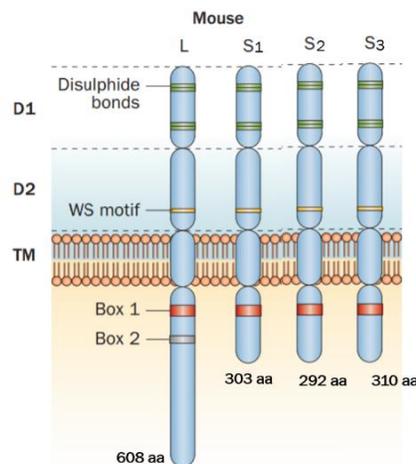


**Fig.5.- Estructura de PRL humana.** Representación estructural de la PRL humana conformada por 4  $\alpha$ -hélices ligeramente enrolladas entre sí que conforman el núcleo de la proteína (Teilum et al., 2005).

La PRL es secretada principalmente por los lactotrofos de la hipófisis anterior, pero también puede ser producida por sitios extra hipofisarios, como ovarios, próstata, glándulas mamarias, tejido adiposo, cerebro y células del sistema inmune (Borba et al., 2018). Mantiene una retroalimentación negativa sobre su propia producción al estimular la liberación de dopamina en el hipotálamo, efecto similar a los agonistas dopaminérgicos: bromocriptina y cabergolina (Al-Chalabi et al., 2021).

En vertebrados se conocen más de 300 funciones de la PRL, de las cuales la proliferación y diferenciación de células epiteliales mamarias, la lactancia y la promoción de la neurogénesis son las principales, además de funciones de osmorregulación, inmunorregulación, metabólicas y reproductivas (Bernard et al., 2019; Binart et al., 2010).

La PRL actúa a través de su receptor transmembranal, presente en células de la glándula mamaria, células  $\beta$  pancreáticas, adipocitos y células del sistema inmune (Gorvin, 2015; Recalde et al., 2018). El receptor de PRL (R-PRL) es un receptor de citocinas tipo I, conformado por un dominio extracelular para la unión del ligando, una porción transmembrana helicoidal y una región intracelular. El gen que codifica para el R-PRL humano se localiza en el cromosoma 5, mientras que en el ratón se localiza en el cromosoma 15. En mamíferos, el gen del R-PRL presenta aproximadamente 10 exones y un tamaño total mayor a 100 kb (Bernard et al., 2019; Binart et al., 2010; Bole-Feysot et al., 1998)



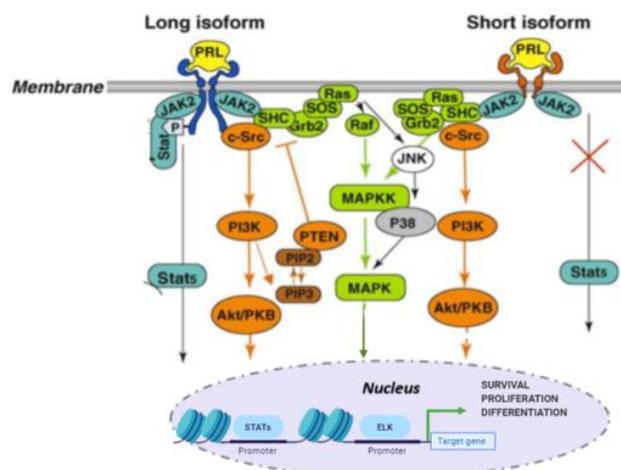
**Fig.6.- Isoformas del R-PRL de ratón.** El R-PRL se encuentra conformado por un dominio extracelular que incluye a la vez dos dominios de unión (D1 y D2), un dominio transmembranal idéntico en todas las especies y un dominio intracelular de longitud y composición variable. D1: dominio de unión 1; D2: dominio de unión 2; L: isoforma larga; S<sub>1,2,3</sub>: Isoformas cortas; TM: dominio transmembranal; WS: motivo serina-triptófano (modificado de Bernard et al., 2015).

A través de splicing alternativo se generan varias isoformas diferentes del R-PRL, caracterizadas por dominios extracelulares idénticos pero que difieren en el tamaño y la secuencia de la porción intracelular, los cuales cuentan con diferentes propiedades de señalización. En ratón se conocen 4 isoformas del R-PRL, una larga de 608aa y tres cortas de 303, 292 y 310aa (Fig.6) (Bole-Feysot et al., 1998; Davis & Linzer, 1989).

El dominio extracelular del R-PRL se caracteriza por dos pares de puentes disulfuro entre residuos de cisteína en su subdominio D1 y un motivo WS (Tpr-Ser-x-Tpr-Ser) localizado en el subdominio D2, ambos esenciales para un adecuado plegamiento y unión con su ligando. Se desconoce el papel del dominio transmembrana en la activación del R-PRL, pero el dominio intracelular es diferente entre las diversas isoformas, excepto por 2 regiones relativamente conservadas, denominadas caja 1 y caja 2. La caja 1 es un motivo rico en prolina localizado cerca de la membrana, mientras que la caja 2 está menos conservada y ausente en la isoforma corta, consiste en una sucesión de residuos hidrófobos negativos seguidos de residuos positivos (Bernard et al., 2015; Freeman et al., 2000)

El R-PRL puede asociarse con tres tipos de ligandos: la hormona del crecimiento, lactógeno placentario y la misma PRL. Su activación inicia con una dimerización secuencial inducida por el ligando, en el caso de PRL el sitio de unión 1 interactúa con una molécula del R-PRL y posteriormente el sitio de unión 2 de la misma molécula de PRL interacciona con la segunda molécula del R-PRL. El R-PRL no cuenta con actividad tirosina cinasa intrínseca, pero señala a través de proteínas citoplasmáticas, un ejemplo de ellas es JAK2 (Bernard et al., 2019; Freeman et al., 2000).

Como se observa en la figura 7, la isoforma larga puede señalar a través de la vía JAK/Stat, PI3K/AKT y MAPK, activando la expresión de genes involucrados en diferenciación, proliferación y supervivencia celular; mientras que, la isoforma corta solo señala a través de las rutas PI3K/AKT y MAPK (Bernard et al., 2019).



**Fig.7.- Señalización de las isoformas del R-PRL.** La activación del R-PRL por su ligando señalará dependiendo la isoforma presentada. La isoforma larga señala a través de JAK/Stat, PI3K/AKT y MAPK (iniciada por los intermediarios Shc / Grb2 / Sos / Ras / Raf), mientras que la isoforma corta señala solo por las vías PI3K/AKT y MAPK. La fosfatasa PTEN actúa como regulador negativo de PI3K (modificado de Binart et al., 2010) .

## ANTECEDENTES

---

### **Prolactina y Lupus Eritematoso Sistémico**

Se ha demostrado que los pacientes con LES tienden a presentar niveles elevados de PRL sérica que se ha asociado con el LES activo (Leaños-Miranda et al., 2001; Rezaieyazdi & Hesamifard, 2006; Jara et al., 2017). Se ha favorecido el estudio de LES en modelos de ratón que desarrollan manifestaciones clínicas similares a esta autoinmunidad.

A través de estos modelos de LES, se ha mostrado que la hiperprolactinemia se asocia con mayores concentraciones de autoanticuerpos de isotipo IgG, autoanticuerpos antinucleares, inmunocomplejos y presencia de glomerulonefritis, factores que aceleran la actividad del LES (Jara et al., 2017). En ratones hembra de la cepa NZBxNZW F<sub>1</sub> que fueron administrados con bromocriptina (BRC), un agonista dopaminérgico, se asoció una disminución de la actividad del LES y un incremento en la sobrevivencia de los ratones (McMurray, 2001).

En nuestro grupo de trabajo, se ha tratado de comprender el papel de la PRL en el desarrollo del LES utilizando ratones MRL/lpr. Se ha demostrado de manera *ex vivo* que los linfocitos B-GC y Tfh expresan la isoforma larga del R-PRL tanto en las cepas que desarrollan LES como en la cepa control (C57BL/6) (Alemán-García et al., 2021; Carreon, 2019). En los linfocitos Tfh de los ratones que desarrollan LES la expresión del receptor es mayor e incrementa conforme a la edad, presentando un patrón diferente con respecto a la cepa control. (Alemán-García et al., 2021).

Asimismo, se ha identificado de manera *ex vivo* el incremento gradual de linfocitos Tfh respecto a la edad en ratones MRL/lpr en comparación con la cepa control. Se ha identificado la correlación tanto de números absolutos como porcentaje respecto al incremento de linfocitos Tfh, la presencia de proteinuria y el incremento de anticuerpos antinucleares que inducen daño renal en los ratones MRL/lpr. Mientras que de manera *in vitro* la PRL incrementa la activación de los Tfh que expresan moléculas de coestimulación como OX40, e igualmente, incrementa el número absoluto de Tfh secretores de IL-21 en ratones MRL/lpr (Alemán, 2020).

Por otro lado, en la cepa MRL/lpr se ha determinado que la PRL rescata a los linfocitos B inmaduros de la apoptosis, ya que promueve la transcripción de genes anti-apoptóticos principalmente de la familia Bcl-2 y a Birc5, incrementando el desarrollo y manifestaciones de la enfermedad al mantener células con potencial autorreactivo. Ya que el gen Birc5 puede actuar como gen anti-apoptótico o favorecer la proliferación (Gil-Kulik et al., 2019; Flores-Fernández et al., 2016). Para el mantenimiento cíclico de los centros germinales también se ha descrito la participación de c-myc, quien es capaz de inducir la expansión de los centros germinales a través de la proliferación y renovación celular (Ramezani-Rad et al., 2020). También, se ha relacionado la participación de la PRL en la activación de c-myc y la consecuente supervivencia celular de células linfoides (Domínguez-Cáceres et al., 2004).

La PRL también incrementa el porcentaje de diferenciación a B-GC, la proliferación de estos linfocitos, la secreción de IL-6, el porcentaje de diferenciación a células plasmáticas e incrementa la expresión del factor de transcripción IRF4, que favorece la diferenciación de linfocitos B-GC a células plasmáticas (Carreon, 2019). Además, existe un incremento en la concentración de autoanticuerpos anti-dsDNA en ratones que desarrollan LES (Legorreta-Haquet et al., 2013).

Sin embargo, no se conoce la vía de señalización que puede activar la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC que nos pueda ayudar a entender el efecto de activación en linfocitos autorreactivos. Por lo que con este proyecto se propone determinar la vía de señalización que activa la PRL, así como los genes que modula a través de la interacción con su receptor expresado en Tfh y B-GC en un modelo de ratón que desarrolla LES.

## **JUSTIFICACIÓN**

---

El LES es una enfermedad multifactorial, crónica y autoinmune que afecta la calidad de vida de los pacientes, se caracteriza por la presencia de clonas autorreactivas y la generación de autoanticuerpos que forman inmunocomplejos que se depositan en diversos órganos induciendo inflamación y daño tisular, incrementando las manifestaciones clínicas de la enfermedad hasta generar un daño sistémico.

Utilizando la cepa de ratón MRL/lpr que desarrolla LES, se ha determinado que ante concentraciones elevadas de PRL se favorece el incremento de autoanticuerpos anti-dsDNA de isotipo IgG, resultando en manifestaciones de la enfermedad más tempranas y severas. De aquí la relevancia de comprender la señalización de PRL en linfocitos Tfh y B-GC, ya que

la interacción entre estas células es importante para la diferenciación de células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. El conocimiento de los mecanismos moleculares de regulación de los linfocitos Tfh y B-GC a través de PRL, servirá de base para probar en el futuro terapias para tratar el LES con antagonistas del R-PRL y/o moléculas involucradas en su señalización.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

La incidencia de LES es mayor en mujeres, por lo que se sugiere una asociación con los niveles de hormonas sexuales como la PRL. Se ha identificado una correlación con el LES activo y los niveles séricos elevados de PRL tanto en pacientes como en modelos de ratón. En ratones de la cepa MRL/lpr se ha evidenciado un aumento de la expresión del R-PRL en linfocitos Tfh. Asimismo, la PRL rescata de la apoptosis a los linfocitos B inmaduros (autorreactivos) favoreciendo la maduración de clonas autorreactivas e incrementa el porcentaje de linfocitos B-GC, así como de células plasmáticas. Además, las concentraciones séricas de PRL en LES correlacionan con el incremento de autoanticuerpos de isotipo IgG anti-dsDNA.

Ya que los linfocitos Tfh y B-GC, también se encuentran incrementados en esta cepa de ratón, es posible que se esté favoreciendo la diferenciación de células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. Por lo que identificar la vía de señalización inducida por PRL en ambos tipos celulares, Tfh y B-GC, en un modelo murino con LES permitirá una mayor comprensión del desarrollo de la enfermedad, surgiendo con ello la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la vía de señalización inducida por PRL en los linfocitos Tfh y B-GC de ratones MRL/lpr que desarrollan LES?

## **HIPÓTESIS**

---

- La PRL señalará a través de STATs, AKT y/o ERK en linfocitos Tfh y B-GC de ratones MRL/lpr que desarrollan LES
- La PRL a través de la señalización de STATs, AKT y/o ERK en linfocitos B-GC, desencadenará la activación de genes involucrados en su proliferación en ratones MRL/lpr que desarrollan LES.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

- Determinar la(s) vía(s) de señalización del R-PRL en linfocitos Tfh y B-GC, así como los genes que se ven afectados en los linfocitos B-GC en ratones MRL/lpr que desarrollan LES.

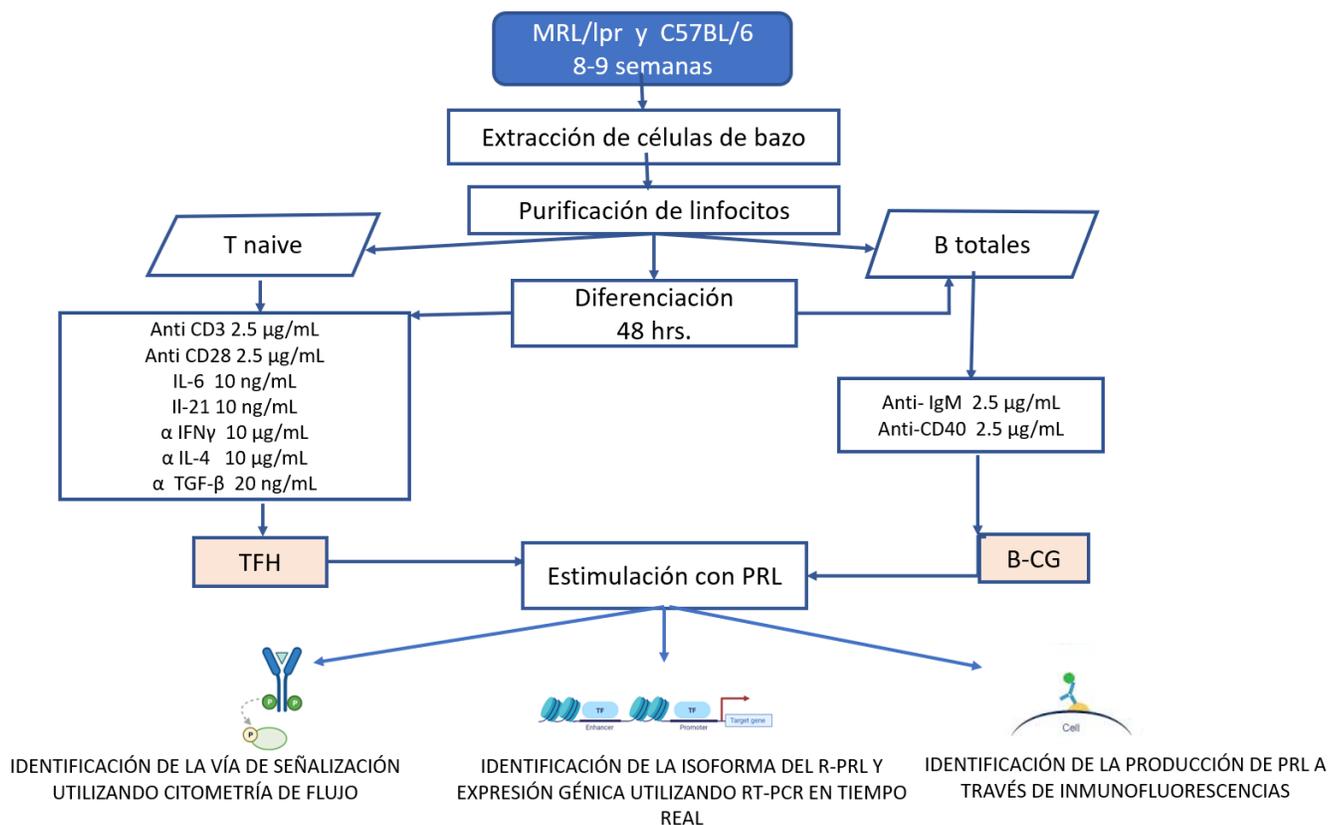
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

1. Evaluar el efecto de la PRL en la señalización de STATs y AKT en los linfocitos Tfh de ratones MRL/lpr que desarrollan LES y de la cepa control C57BL/6.
2. Identificar la isoforma del R-PRL en los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* de ratones MRL/lpr.
3. Evaluar el efecto de la PRL en la señalización de STATs, AKT y ERK en los linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr que desarrollan LES y de la cepa control C57BL/6.
4. Determinar los genes inducidos por la interacción de PRL con su receptor en los linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr que desarrollan LES.
5. Identificar la producción de PRL en los linfocitos B-GC

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos propuestos, se utilizaron ratones MRL/lpr que desarrollan LES y ratones C57BL/6 como grupo control. Los ratones se utilizaron de 8 y 9 semanas de edad cuando los ratones MRL/lpr aún no presentan manifestaciones de la enfermedad. Se obtuvieron células de bazo y se purificaron linfocitos T y B. Los linfocitos purificados se diferenciaron *in vitro* a linfocitos Tfh y B-GC durante 48 h en incubación con anticuerpos que favorecen su diferenciación. En los linfocitos diferenciados se identificó el efecto de la PRL a través de técnicas de citometría de flujo, RT-PCR tiempo real e inmunofluorescencias (Fig.8).



### Fig.8.- Estrategia experimental

En linfocitos Tfh y B-GC diferenciados *in vitro* de ratones MRL/lpr y C57BL/6 se analizó la vía de señalización inducida por la PRL. En los linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr también se identificó la isoforma del R-PRL y la expresión de BIRC5 y c-myc a nivel de ARNm, así como la producción de PRL. Para los experimentos se utilizó citometría de flujo, RT-PCR tiempo real e inmunofluorescencias. Para resultados complementarios se utilizó la línea celular Nb2-11 dependiente de PRL para su proliferación. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **Hormona**

Se utilizó PRL recombinante de ratón (AFP-405C; National Hormone and Peptide Program, NIH). Cabe mencionar que la concentración utilizada en todo el trabajo experimental fue únicamente de 50ng/mL, de acuerdo con los datos previos de mi grupo de trabajo respecto a las curvas dosis-respuesta de PRL en los linfocitos Tfh y B de centro germinal.

### **Línea celular**

Para comprobar la bioactividad de la PRL, se realizó un bioensayo (descrito posteriormente) con la línea celular Nb2-11 (ECACC, catalogo no. 97041101). El bioensayo se realizó con la única finalidad de comprobar el buen estado de la hormona para poder realizar todos los experimentos del trabajo experimental en los que se utiliza la PRL recombinante de ratón. Las células Nb2-11 son un clon de la línea de linfoma de rata Nb-2, que se derivó de un trasplante de linfoma después de un tratamiento prolongado con estrógenos. Las células son linfocitos pre-T dependientes de hormonas lactogénicas, como la PRL, para el crecimiento celular. La línea celular se mantuvo en medio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (ATCC, USA) previamente inactivado, 1% antibióticos (Invitrogen, USA), 1% piruvato de sodio (Hyclone, USA) y 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol (Invitrogen, USA). Se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Modelo de estudio**

Como cepa control se utilizó la cepa C57BL/6 (Harlan, USA), mientras que como cepa que desarrolla LES se utilizó la MRL/lpr (The Jackson Laboratory, USA) de 8 a 9 semanas (periodo previo al inicio de los síntomas de la enfermedad). Los ratones MRL/lpr y C57BL/6 se reprodujeron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos, en cajas de policarbonato de piso sólido con micro-aislador, con fotoperiodos de 12 horas de luz por día y temperatura ambiente de 22-23°C. Se les proporcionó alimento (18% de proteína cruda, 6% de grasa cruda y no más de 3% de minerales) y agua estéril a libre acceso; así como los cuidados y la atención veterinaria especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la Ley General de Salud y las disposiciones del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas". Para realizar los experimentos los ratones se transportaron en compartimentos cerrados y especiales para el transporte de roedores, hechos de plástico resistente con pequeñas ventilaciones cubiertas con micro-aisladores con las características

según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 al Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### **Obtención de células de bazo**

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical según la NOM062-ZOO-1999. Se obtuvo el bazo de cada ratón. Las células se obtuvieron inyectando el bazo con solución salina estéril (PiSA, México) y se procedió a disgregar el tejido en un colador de nylon de 70  $\mu\text{m}$  (Falcon, USA). Las células se centrifugaron (1200 rpm / 10 minutos), se decantó el sobrenadante y se procedió a lisar eritrocitos con buffer de lisis (Sigma Aldrich, USA) durante 2 minutos; la reacción se detuvo incorporando solución salina estéril fría. Después de centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, las células se resuspendieron en 10 mL de solución salina estéril y se procedió a contarlas con azul tripano utilizando una cámara de Neubauer.

### **Purificación de linfocitos T naive y B totales**

A partir de células provenientes de bazo, se purificaron por selección negativa los linfocitos T naive y B totales. Para las células T CD4 naive se utilizó el kit MojoSort™ Mouse CD4 naive T Cell Isolation Kit (BioLegend, USA) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Mientras que, para los linfocitos B totales las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD43 conjugado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania), a 4°C por 15 minutos. Las muestras se lavaron y pasaron por una columna de separación MACS LD (Miltenyi Biotec, Alemania).

### **Diferenciación de linfocitos Tfh *in vitro***

Los linfocitos T CD4 naive purificados se cultivaron en medio TexMacs libre de suero (Miltenyi Biotec, Alemania), se estimularon con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 (clona 145-2C11, eBioscience, USA) y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD28 (clona 37.51, eBioscience, USA), así como los anticuerpos  $\alpha$ -IL-4 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; clona 11B11, eBioscience, USA),  $\alpha$ -TGF- $\beta$  (20ng/mL; Peprotech, USA) y  $\alpha$ -IFN $\gamma$  (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; clona XMG12, eBioscience, USA) que bloquean la polarización a los perfiles Th2, Th17 y Th1, respectivamente. También se incorporaron las citocinas IL-6 (10ng/mL; Miltenyi Biotec, USA) e IL-21 (10ng/mL; Miltenyi Biotec, USA). El cultivo se incubó durante 48 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **Diferenciación de linfocitos B-GC *in vitro***

Los linfocitos B totales purificados se cultivaron en medio TexMacs libre de suero (Miltenyi Biotec, Alemania), se estimularon con anti-IgM (2.5 µg/mL; Jackson Inmuno Research, USA) y anti-CD40 (2.5 µg/mL; Miltenyi Biotec, Alemania). El cultivo se incubó durante 48 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **Tinción para linfocitos Tfh y B-GC**

Los linfocitos Tfh y B-GC diferenciados, se lavaron con FACS buffer y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con el marcador de viabilidad Ghost Dye Red 780, APCCy7 (Tonbo Biosciences, USA). Las muestras celulares se fijaron con paraformaldehído al 2%. Los linfocitos Tfh se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromos dirigidos contra determinantes específicos, por lo cual se usó anti-CD4 PE-Cyanine5 (clona RM4-5; eBioscience, USA), anti-CD185 (CXCR5) PE-Cyanine7 (clona SPRCL5; eBioscience, USA) y anti-PD-1 APC (clona J43; eBioscience, USA); mientras que, para identificar a los linfocitos B-GC, los linfocitos B diferenciados se incubaron con los anticuerpos conjugados con fluorocromos dirigidos hacia CD19-FITC (clona 1D3; BioLegend, USA ) y GL-7-eFluor 450 (clona G-L7; Invitrogen, USA) . Las tinciones se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad. Los eventos celulares fueron adquiridos mediante el citómetro MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Alemania), y los resultados obtenidos se analizaron con el software Flowjo 10.

### **Tinción para STAT's, AKT y ERK**

Se realizó un recambio de medio en los linfocitos Tfh y B-GC diferenciados, por lo cual a las 48 horas de diferenciación se incubaron con medio fresco TexMacs durante 8 horas. Posterior a este periodo de tiempo se incorporó PRL (50ng/mL) o medio y se incubaron durante 30 minutos. Al término de la incubación, los linfocitos se fijaron con paraformaldehído al 2%. Se realizó tinción de superficie para identificar a los linfocitos Tfh y B-GC, posteriormente se permeabilizaron durante 30 minutos a 4°C, con Perm Buffer III de BD Phosflow (BD Biosciences, USA) para medir la fosforilación de STATs y con IC Fixation Buffer (eBioscience, USA) para medir la fosforilación de AKT y ERK. Las muestras se lavaron e incubaron con los anticuerpos anti-pSTAT1-PE (clona A15158B; Biolegend, USA), anti-pSTAT3-PE (clona 13A3-1; Biolegend, USA), anti-pSTAT5-PE (clona SRBCZX; eBioscience, USA), anti-pAKT-PE (clona REA359; Miltenyi Biotec, Alemania ) y anti-pERK1/2-PE (clona 6B8B69; Biolegend, USA), durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se lavaron y leyeron en el citómetro MACS

Quant (Miltenyi Biotec, Alemania). Los resultados obtenidos se analizaron a través del software Flowjo 10.c vfdb

### **Inhibición de pSTAT3 en linfocitos Tfh**

Para comprobar que PRL se encuentra señalizando a través de pSTAT3 en linfocitos Tfh diferenciados *in vitro* de ratones de la cepa MRL/lpr de 8 a 9 semanas de edad, se procedió a preincubar a los linfocitos Tfh de la cepa MRL/lpr y de la cepa control C57BL/6 posterior a las 8 horas de incubación con medio fresco TexMacs, con el inhibidor Stattic (10  $\mu$ M; Stattic Cell Signaling, USA) durante 30 minutos. Posteriormente los linfocitos Tfh se incubaron con PRL (50ng/mL) o medio TexMacs. Las muestras se fijaron con paraformaldehído 2% y se realizó una tinción con anticuerpos acoplados a fluorocromos para identificar la población de linfocitos Tfh y la fosforilación de STAT3, a través de citometría de flujo.

### **Extracción de ARN**

Se purificaron y diferenciaron durante 48 horas linfocitos B totales de bazo de ratones MRL/lpr y C57BL/6 a linfocitos B-GC. Los linfocitos B presentaron una pureza del 93-96% según se define mediante la tinción con anticuerpos dirigidos hacia CD19-FITC (clona 1D3; BioLegend, USA), así como una viabilidad del 95% inmediatamente después de la purificación y del 60-73% a las 48 horas en cultivo de acuerdo con la tinción con el marcador de viabilidad Ghost Dye Red 780, APCCy7 (Tonbo Biosciences, USA).

Se agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen, USA) por cada  $300 \times 10^5$  linfocitos B-GC. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L de glicógeno. Las muestras se homogeneizaron y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se incorporaron 200  $\mu$ L de cloroformo (Sigma Aldrich, USA), se homogeneizó y las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo estéril. Se adicionaron 550  $\mu$ L de isopropanol (J.T Baker, USA) y las muestras se incubaron durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el exceso de isopropanol; el botón obtenido se lavó con 1 mL de etanol (Sigma Aldrich, USA) al 75% y se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 minutos 2 veces. El ARN se resuspendió en 12  $\mu$ L de agua inyectable estéril, se cuantificó y evaluó su pureza utilizando el espectrofotómetro GeneQuant Pro (Gemini BV, Holanda).

### **RT-PCR tiempo real**

Para identificar la expresión de la isoforma del R-PRL y de los genes inducidos por la PRL en los linfocitos B-GC se realizó RT-PCR tiempo real. A partir de ARN se generó ADNc utilizando ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabs, USA). Se utilizó  $\beta$ -actina como gen constitutivo, el par de primers utilizados fue el siguiente: fwd 5' GTGGTACGACCAGAGGCATAC 3' y rev 5' AAGGCCAACCGTGAAAAGAT 3'. Los primers de las isoformas del R-PRL, de Birc5 y c-myc fueron los siguientes:

- Birc5: fwd 5' CATCTGCTTGACAGTGAGG 3' y rev 5' CCCGATGACAACCCGATA 3'
- c-myc: fwd 5' GCGACTCTGAAGAAGAGCAAG 3' y rev 5' GCCTCGGGATGGAGATGAG 3'
- R-PRL isoforma larga: fwd 5' AAAGCTGGCCAGATCTTTCTC 3' y rev 5' GCTTGAGGAATCAGCCAAGA 3'
- R-PRL isoforma corta: fwd 5' GGATGGTTTCACAATCCACA 3' y rev 5' GAGCACAAGAACAGGGGAAA 3'

Las muestras se corrieron en el termociclador LightCycler II (Roche) utilizando FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Alemania). Las temperaturas utilizadas en el paso de alineamiento para Birc5 y las isoformas del R-PRL fue de 60 °C y para c-myc de 58 °C. La curva de fusión al término de la PCR indicó que las diferentes muestras que contenían el mismo par de primers, tienen temperaturas de fusión del amplicón coincidentes. La expresión relativa se calculó utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### **Bioensayo de células Nb2-11**

El bioensayo de la línea celular Nb2-11 se realizó como se describió por Tanaka et. al. (1980). Las células se incubaron durante 24 h con RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 1% de suero fetal bovino (ATCC, USA) previamente inactivado con calor, 1% de antibióticos (Invitrogen, USA), 1% de piruvato de sodio (Hyclone, USA) y 0.1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Invitrogen, USA) para sincronizar el ciclo celular. Posteriormente, las células se lavaron con PBS/BSA al 0.1%, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y se incubaron con 1uM de CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, Invitrogen, CaI, USA) durante 20 minutos a 37°C en movimiento continuo (500 rpm). Se detuvo la reacción adicionando PBS/BSA al 0.2% frío. Las células se lavaron con medio TexMacs (Miltenyi Biotec, Alemania) y la reanudación de su ciclo celular se logró mediante la adición de concentraciones crecientes de PRL de ratón recombinante. Se incubaron alrededor de 80,000 células durante 72 h con medio TexMacs y con diferentes concentraciones de PRL para realizar una curva dosis-respuesta en la línea celular Nb2-11 que compruebe la eficacia de la hormona. La concentraciones utilizadas fueron

las siguientes: 50ng/mL, 14 ng/mL, 7 ng/mL, 3.5 ng/mL, 1.75 ng/mL, 0.875 ng/mL, 0.438 ng/mL, 0.219 ng/mL y 0.109 ng/mL. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Proliferación de células Nb2-11 con sobrenadantes de linfocitos B-GC**

La bioactividad similar a la PRL se evaluó con sobrenadantes de células B-GC diferenciadas *in vitro* durante 48 h con 2.5 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml de anti-IgM (Jackson Inmuno Research, USA) y anti-CD40 (Miltenyi Biotec, Alemania) durante 72 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El efecto de los sobrenadantes sobre la proliferación de células Nb2-11 también se analizó con CFSE.

### **Inmunofluorescencia de células B-GC**

Se utilizaron células B-GC diferenciadas *in vitro* con 2.5, 5 y 10 µg/mL de IgM y CD40. Las células se colocaron directamente en portaobjetos de vidrio cargados. Se fijaron y permeabilizaron durante 15 minutos a 4°C con BD Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, Cal, USA) y se incubaron con los siguientes anticuerpos durante toda la noche a TA: anti-mProlactina biotinilado (R&D SYSTEMS, MN, USA) y anti-CD19 FITC (clona 6D5; Miltenyi Biotec, Alemania). Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios: anti-rata IgG(H+L) AF488 (Jackson Immuno Research, West Grove, USA) y estreptavidina APC. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (Invitrogen, Cal, USA) durante 10 min y los portaobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse (Nikon, ME, NY, USA) utilizando NIS Elements v.4.50. La obtención de imágenes se realizó utilizando una lente de objetivo de 20x (dry, NA 0.8). Las imágenes se analizaron utilizando el software FIJI ImageJ.

### **Análisis estadístico**

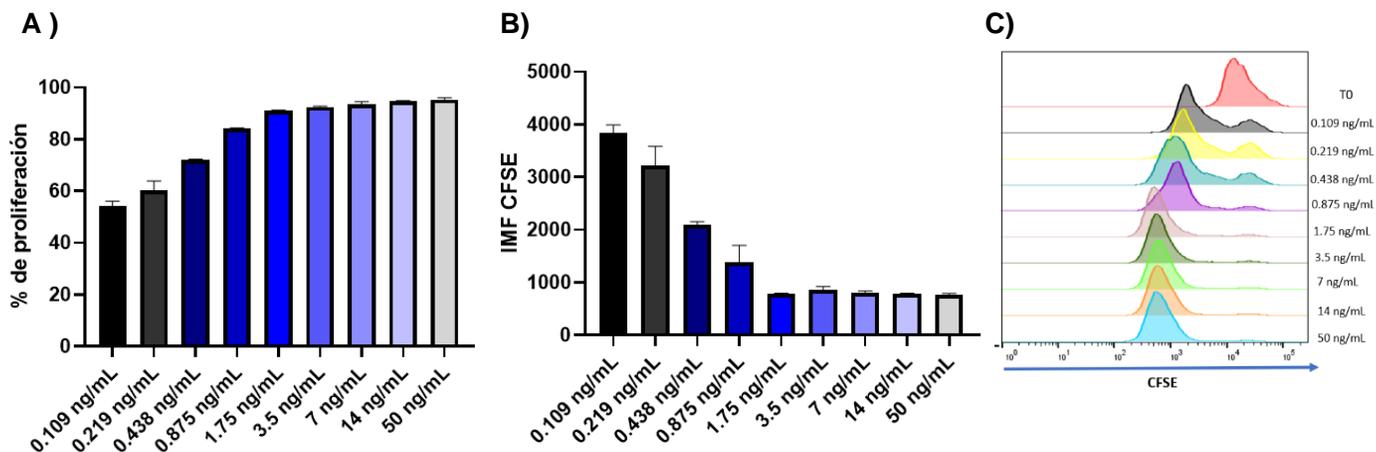
Los resultados se describieron de acuerdo con la distribución de los datos en promedio y desviación estándar. Los datos se compararon mediante la prueba de t student y las diferencias entre grupo se determinaron utilizando la prueba ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.0.

## RESULTADOS

### Curva dosis-respuesta de PRL en la línea celular Nb2-11

Se procedió a comprobar la bioactividad de la PRL recombinante de ratón en la línea celular Nb2-11. Ya que la línea celular es dependiente de PRL para su proliferación, a través de la incorporación de carboxifluoresceína (CFSE), un marcador útil para la división celular, se identificó un incremento gradual en el porcentaje de proliferación de las células Nb2-11 a través de una serie de concentraciones crecientes de PRL.

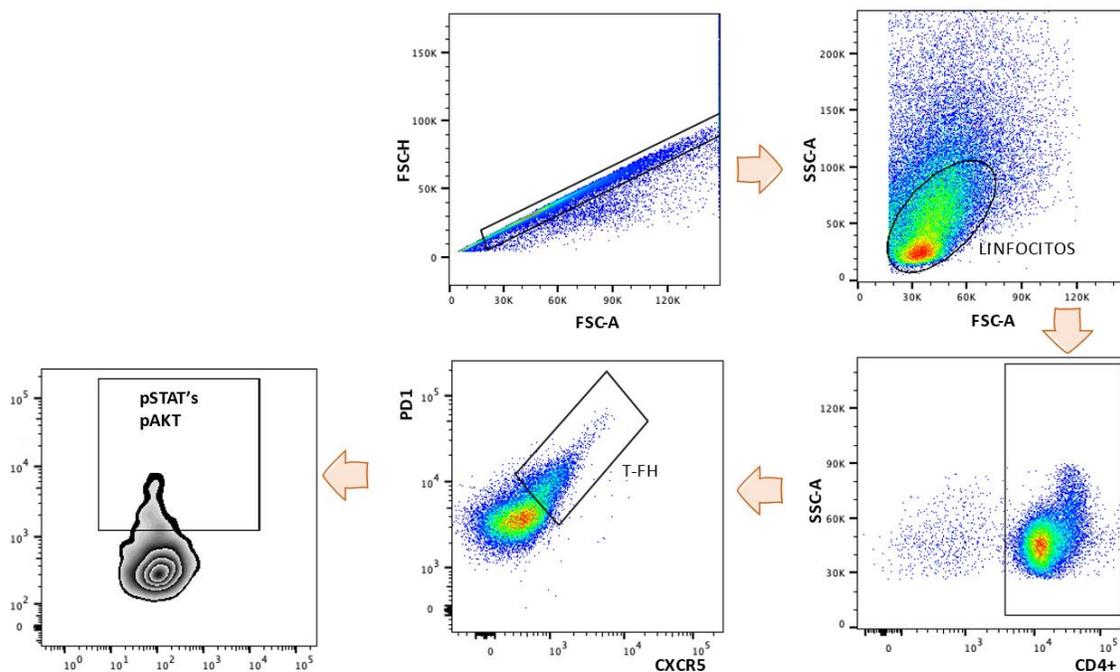
Como se observa en la figura 10A, las células Nb2-11 alcanzan hasta un  $95.3 \pm 0.70$  % de proliferación cuando son incubadas con 50ng/mL de PRL, seguido de la consecuente disminución de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de la CFSE ( $\bar{X} 761 \pm 28.28$ ) (Fig. 9B). La representación gráfica de dichos datos se puede observar en el histograma de la figura 10C, donde las células Nb2-11 tienen menor IMF de CFSE por cada ciclo de proliferación dependiente de la concentración de PRL respecto al tiempo cero (T0) cuando las células aún no proliferan.



**Fig.9.- Proliferación de la línea celular Nb2-11 inducida por una curva dosis-respuesta de PRL.** Las células se incubaron durante 72 h con diferentes concentraciones de PRL y medio TexMacs libre de suero. A) Porcentaje de proliferación de las células Nb2-11 a través de una serie de diluciones crecientes de PRL; B) IMF de CFSE respecto a la proliferación de células Nb2-11 estimuladas con PRL; C) Representación por histogramas de la proliferación de células Nb2-11 y la subsecuente disminución de CFSE; n=3.

## La PRL favorece la señalización de STAT 3 en los linfocitos Tfh

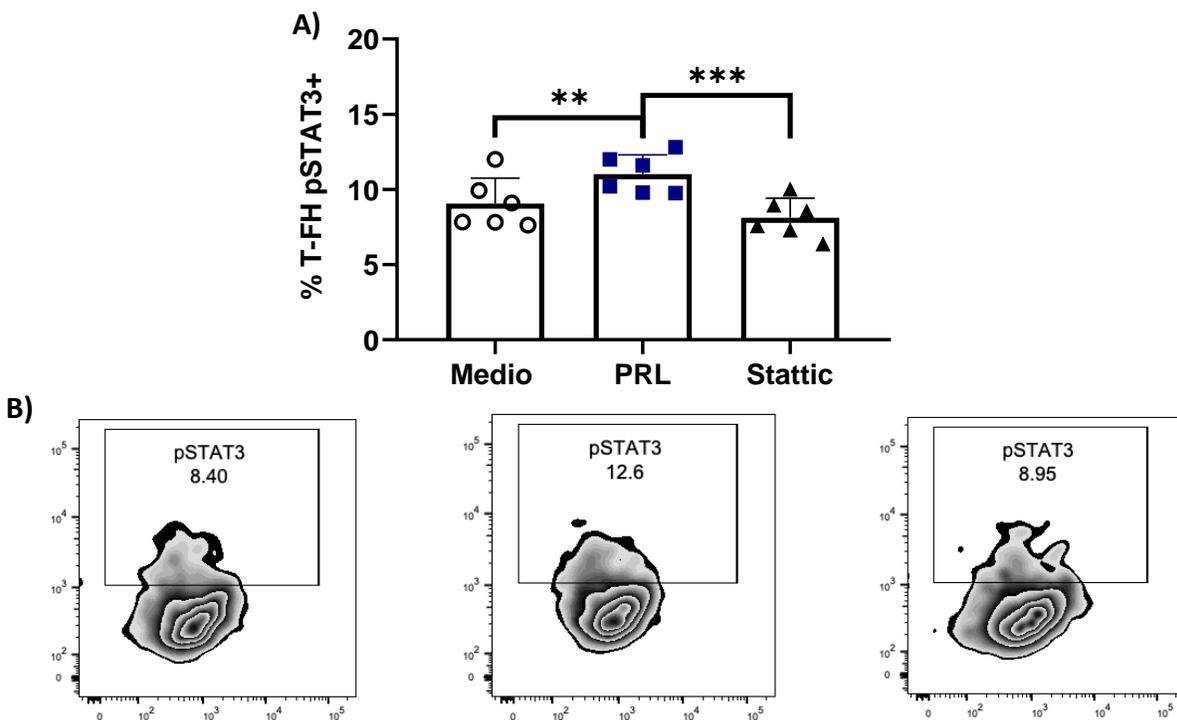
Una vez que se comprobó una adecuada función biológica de la PRL, se decidió realizar los experimentos de señalización. Se determinó la vía de señalización inducida por PRL en linfocitos Tfh diferenciados de manera *in vitro*, se evaluó la fosforilación de STAT1 (pSTAT1), STAT3 (pSTAT3), STAT5 (pSTAT5), y AKT (pAKT). Los linfocitos T naive de ratones MRL/lpr y C57BL/6 de 8 semanas se diferenciaron a Tfh durante 48 h en presencia de IL-6 e IL-21, citocinas que señalizan a través de la vía JAK/STAT3 (Wu et al., 2018) , por lo cual las células se dejaron incubar en medio sin estímulo durante 8 horas antes de colocar la PRL, con el fin de quitar el microambiente que pudiera afectar la veracidad del experimento. La identificación de las fosfoproteínas se determinó a través de citometría de flujo, por lo cual se utilizó la estrategia de análisis que se observa en la figura 10.



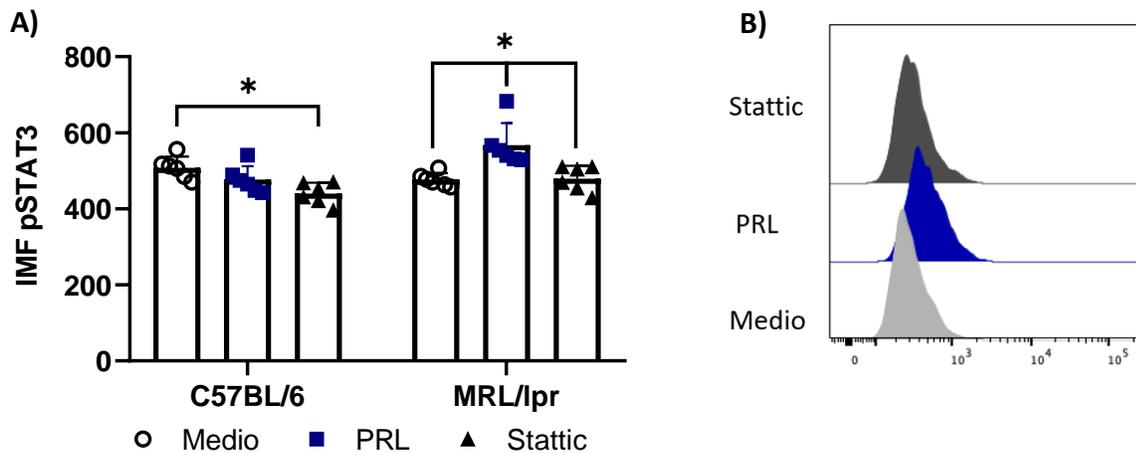
**Fig.10.- Estrategia de análisis utilizada en linfocitos Tfh.** Los linfocitos Tfh diferenciados *in vitro* durante 48 horas de la cepa de ratón MRL/lpr y C57BL/6 de 8 semanas se marcaron con anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos hacia CD4, PD1 y CXCR5. El análisis se realizó seleccionando los eventos simples. Por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A), se seleccionó la población de linfocitos y de ahí la región de linfocitos CD4+. De la región de linfocitos CD4+ se seleccionó la región de linfocitos Tfh por el fenotipo PD1+CXCR5+, en la cual se determinó la fosforilación de STATs y AKT.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de pSTAT3 en los linfocitos Tfh de ratones MRL/lpr estimulados con PRL. El porcentaje de linfocitos pSTAT3+ estimulados con PRL ( $\bar{X}$  11.03  $\pm$  1.28), fue mayor en comparación con los linfocitos que se incubaron sólo con medio ( $\bar{X}$  9.05  $\pm$  1.70). Para confirmar que la señalización del R-PRL sea inducida por STAT3, los linfocitos se pre-incubaron con el inhibidor "Stattic" de esta fosfoproteína seguido del estímulo con PRL, encontrándose así una disminución del porcentaje de linfocitos pSTAT3+ ( $\bar{X}$  8.11  $\pm$  1.30) (Fig.11).

La IMF de pSTAT3 ( $\bar{X}$  567.33  $\pm$  58.47) también se encontró incrementada cuando se estimuló con PRL respecto a los linfocitos incubados con medio ( $\bar{X}$  476.67  $\pm$  17.94). El efecto se vio revertido con el inhibidor de pSTAT3 ( $\bar{X}$  479.33  $\pm$  33.97), a comparación de las células estimuladas solamente con PRL. En los linfocitos de los ratones de la cepa control C57BL/6 no hubo cambio alguno de la IMF cuando los linfocitos se incubaron con medio ( $\bar{X}$  507.83  $\pm$  29.65) y con PRL ( $\bar{X}$  476.67  $\pm$  35.93). Sin embargo, cuando los linfocitos se pre-incubaron con Stattic, la IMF de pSTAT3 se encontró disminuida ( $\bar{X}$  439.83  $\pm$  11.87) (Fig.12).

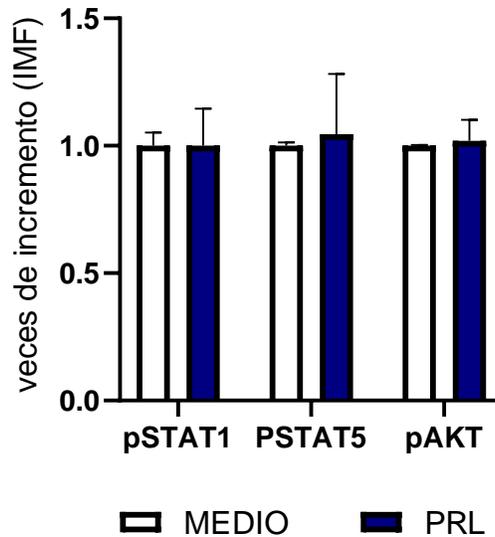


**Fig.11.- PRL incrementa el porcentaje de linfocitos Tfh pSTAT3+.** Incremento del porcentaje de linfocitos diferenciados *in vitro* de la cepa que desarrolla LES (MRL/lpr) y la cepa control (C57BL/6). A) Porcentaje de linfocitos Tfh pSTAT3+ con medio, con PRL (50ng/mL) y con el inhibidor stattic más PRL (50ng/mL). B) Dot Plot representativo del porcentaje de linfocitos pSTAT3+ estimulados con PRL. n=6 \*p < 0.05.



**Fig.12.- PRL incrementa la IMF de pSTAT3 en linfocitos Tfh.** Identificación de la fosforilación de STAT3 en linfocitos Tfh diferenciados *in vitro* de la cepa MRL/lpr que desarrolla LES y la cepa control C57BL/6. A) IMF de pSTAT3 con medio, con PRL (50ng/mL) y con el inhibidor stattic más PRL (50ng/mL), B) Histograma representativo del incremento de la IMF de pSTAT3 a través de la PRL en la cepa MRL/lpr. n=6 \*p < 0.05.

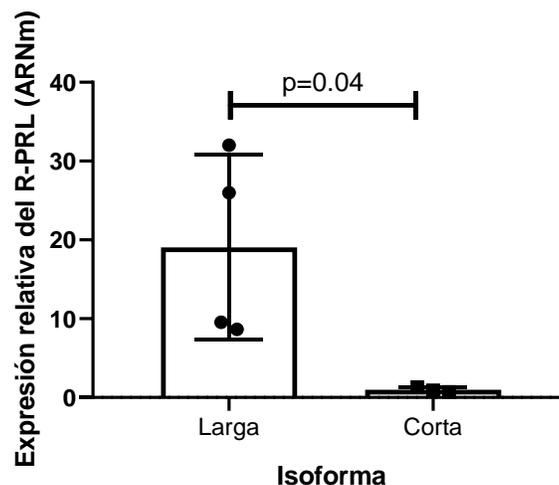
Por otra parte, como se observa en la figura 13, no se encontró un incremento de la fosforilación de STAT1, STAT5 y AKT de los linfocitos estimulados con PRL con respecto a aquellos linfocitos no estimulados.



**Fig.13.- PRL no incrementa pSTAT1, pSTAT5 y pAKT en linfocitos Tfh.** IMF de pSTAT1, pSTAT5 y pAKT en linfocitos Tfh diferenciados *in vitro* de la cepa MRL/lpr. La gráfica representa datos normalizados respecto a los linfocitos no estimulados. n= 6.

## Los linfocitos B-GC expresan principalmente la isoforma larga del R-PRL

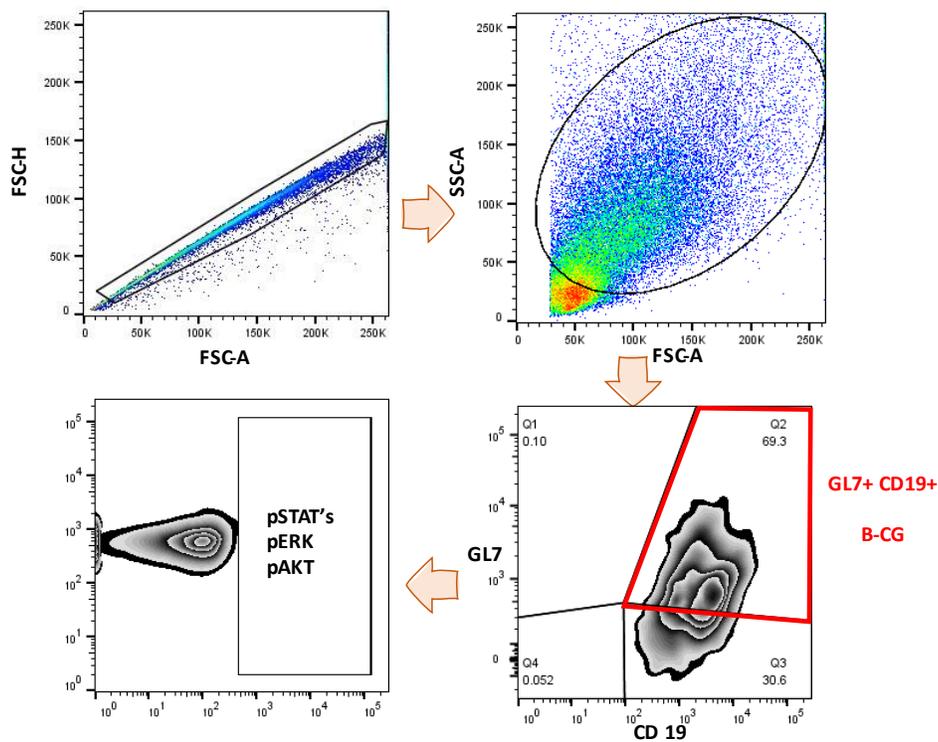
Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se identificó la isoforma larga del R-PRL en linfocitos B-GC provenientes de ratones MRL/lpr de 18 semanas de edad, ratones que ya presentan manifestaciones del LES; los linfocitos se obtuvieron de manera *ex vivo*. Para confirmar los resultados anteriores, aquí se decidió identificar la expresión de la isoformas del R-PRL a nivel de ARNm en los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro*, provenientes de linfocitos B de bazo de ratones MRL/lpr de 9 semanas de edad, encontrando igualmente una mayor expresión de la isoforma larga del R-PRL. Se encontró que los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* tienen mayor expresión de la isoforma larga ( $\bar{X}$  19.05  $\pm$  11), respecto a la isoforma corta ( $\bar{X}$  0.96  $\pm$  0.3) (Fig.14).



**Figura 14. Expresión relativa de las isoformas del R-PRL en los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro*.** A partir de linfocitos B-GC diferenciados sin PRL se realizó RT-PCR tiempo real para determinar la isoforma que se está expresando en estas células. Se observa un incremento significativo de la expresión relativa de la isoforma larga en linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr de 9 semanas.

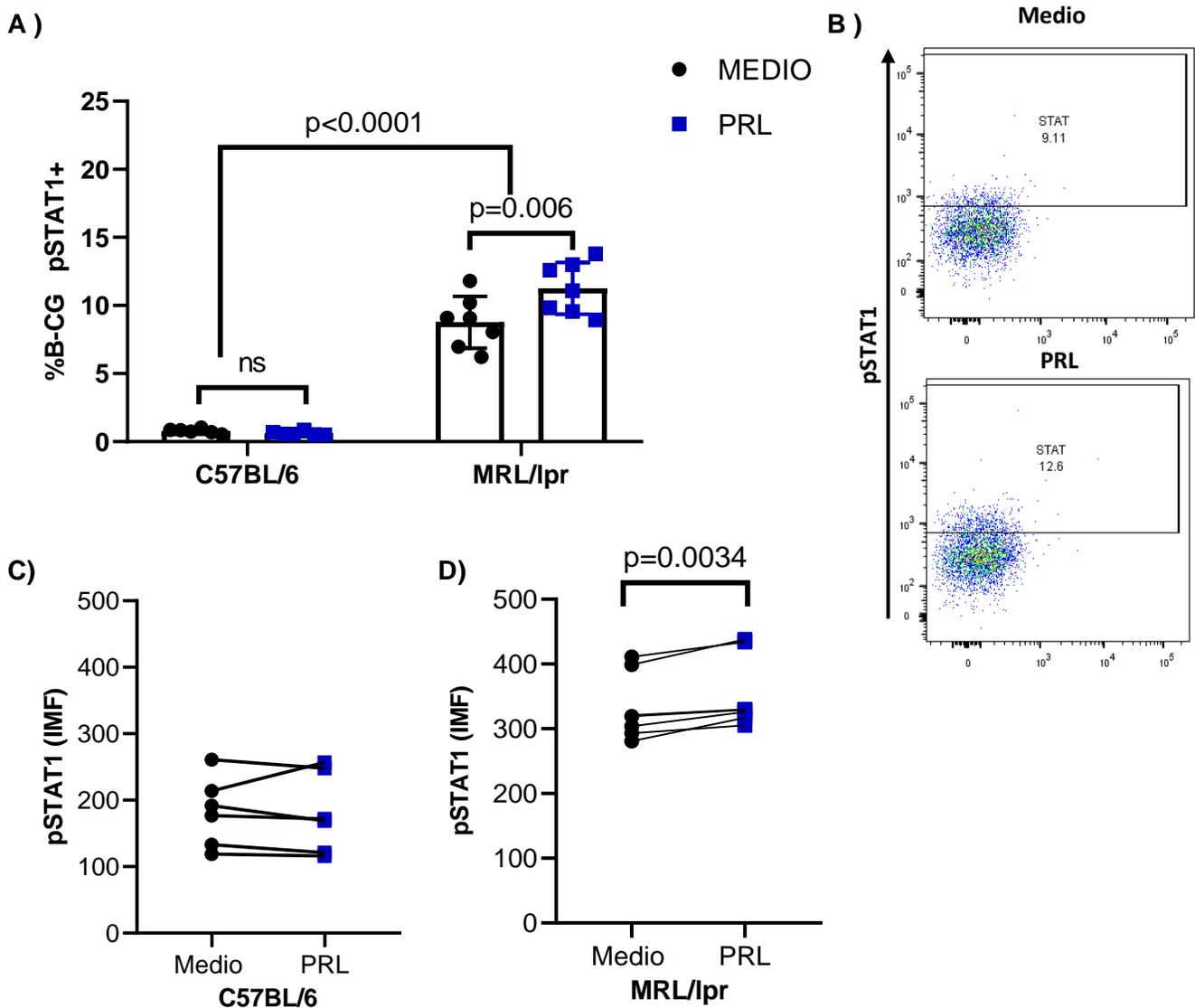
## La PRL favorece la señalización de STAT 1 en los linfocitos B-GC.

Para identificar la vía de señalización que activa la PRL al unirse con su receptor en los linfocitos B-GC diferenciados de manera *in vitro*, se analizó la fosforilación de tres miembros de la familia STAT: STAT1, STAT3 y STAT5, además de la fosforilación de las proteínas ERK (pERK) y AKT (pAKT). Después de 48 horas de diferenciación, se realizó un recambio de medio y las células se incubaron durante 8 horas antes de colocar el estímulo de PRL, para tratar de evadir respuestas de ese microambiente. Los resultados se obtuvieron a través de citometría de flujo. La estrategia de análisis utilizada para citometría de flujo se observa en la figura 15, en donde se eligió la población diferenciada de linfocitos B-GC, para determinar el porcentaje y la IMF de las proteínas fosforiladas involucradas en la señalización de la PRL.



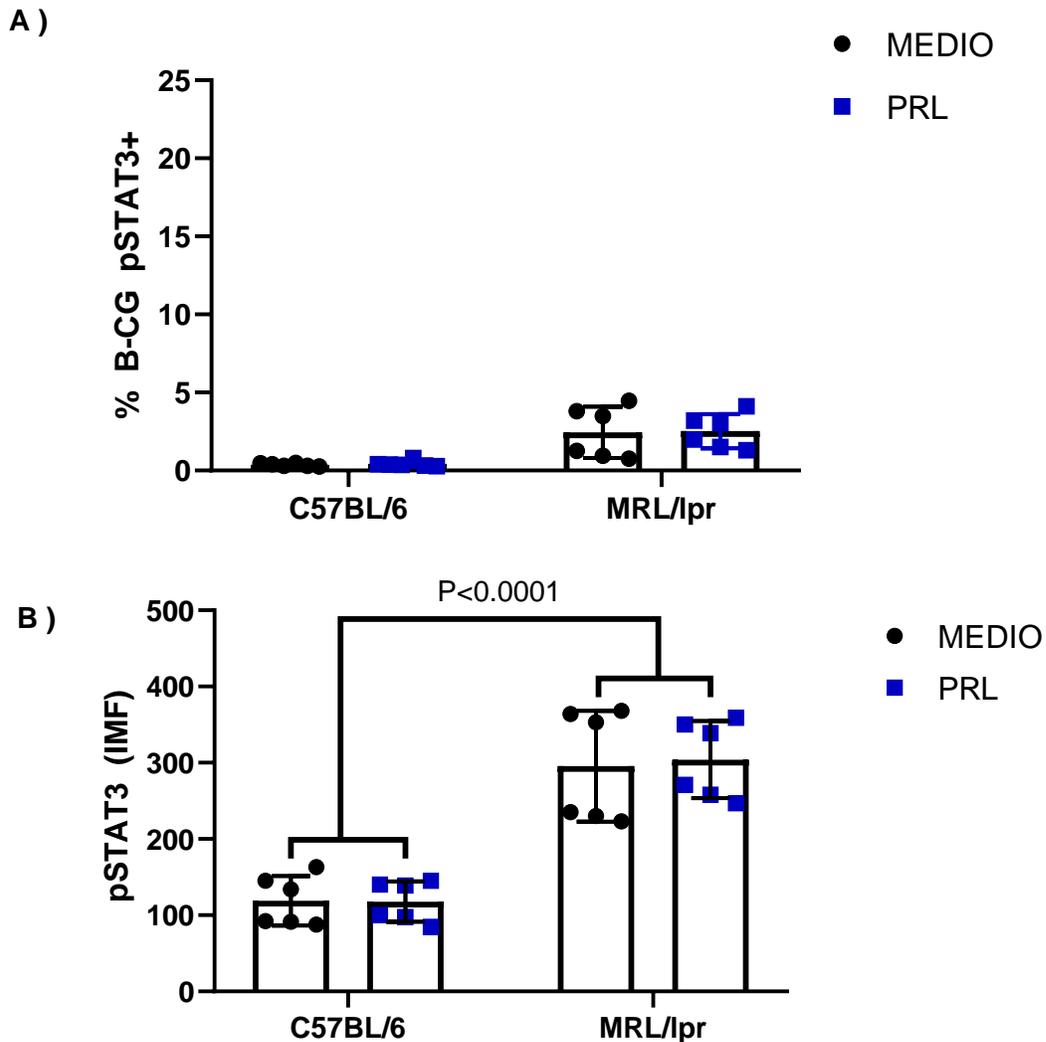
**Figura 15. Estrategia de análisis en linfocitos B-GC diferenciados *in vitro*.** Se tomaron los eventos sencillos, posteriormente por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A) se seleccionó la región de linfocitos y de ahí se seleccionó la región para los linfocitos B-GC de acuerdo con el fenotipo CD19+GL7+ (recuadro rojo). De la región de linfocitos B-GC se determinó la fosforilación de STAT's, ERK y AKT.

Los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de linfocitos B-GC pSTAT1+ de la cepa de ratón MRL/lpr cuando los linfocitos B-GC se estimularon con PRL ( $\bar{X}$  11.26  $\pm$  1.89;  $p=0.007$ ), no así para la cepa C57BL/6 ( $\bar{X}$  0.61  $\pm$  0.13). La IMF de pSTAT1 también se observó incrementada en la cepa MRL/lpr ( $\bar{X}$  354.14  $\pm$  56.58;  $p=0.0034$ ) en comparación con la cepa control donde no se observó una diferencia significativa cuando los linfocitos se estimularon con PRL ( $\bar{X}$  180.5  $\pm$  60.52). Sin embargo, tanto el porcentaje como la IMF de pSTAT1 se encuentra incrementada en la cepa MRL/lpr respecto con la cepa C57BL/6 aún sin el estímulo de PRL (Fig.16).



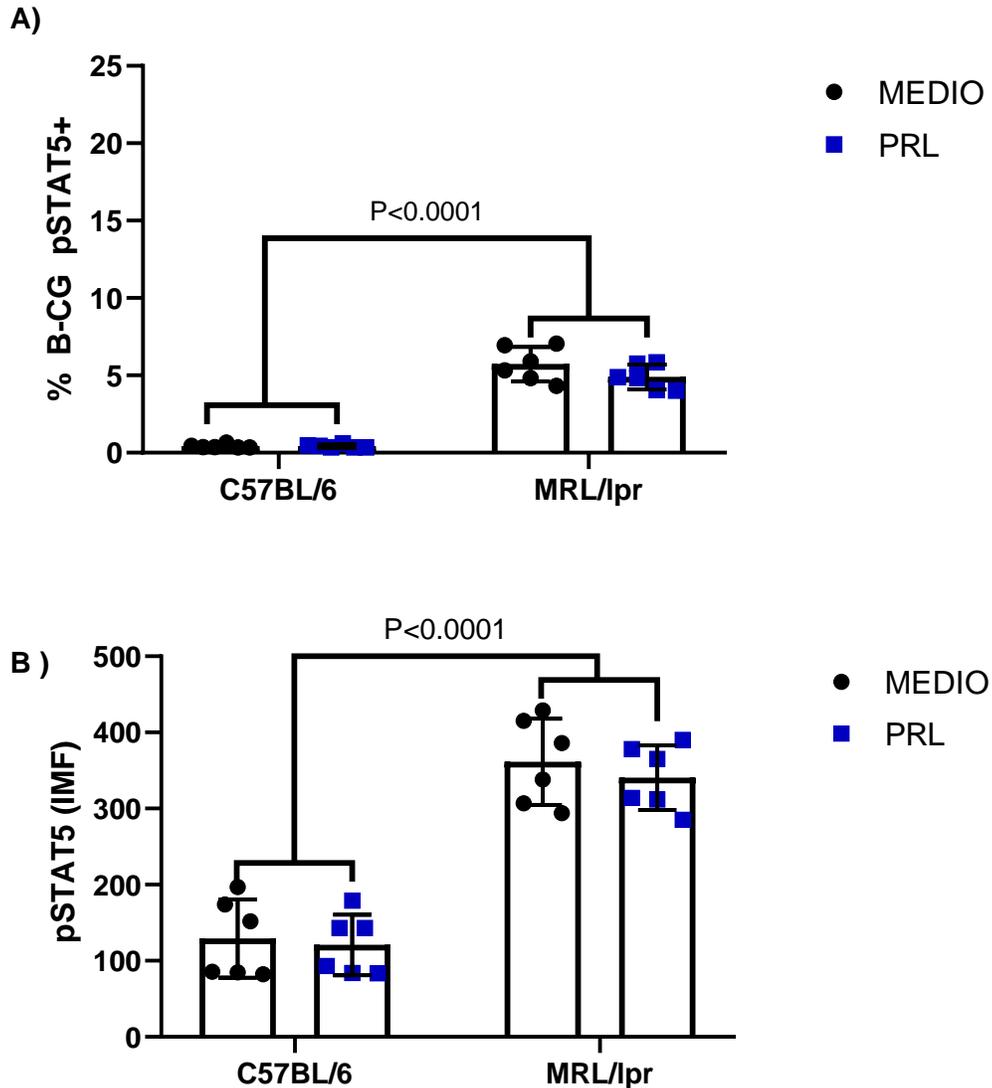
**Figura 16. La PRL incrementa la fosforilación de STAT1 en los linfocitos B-GC.** Linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* estimulados con PRL (50ng/mL). **A)** Porcentaje de B-GC pSTAT1+ **B)** Dot Plot representativo del porcentaje de pSTAT1 de la cepa MRL/lpr **C,D)** IMF de pSTAT1. C57BL: n= 6, MRL/lpr: n=7.

La PRL no favoreció la fosforilación de otros miembros de la familia STAT. No se observó un incremento significativo por PRL en el porcentaje de B-GC pSTAT3+ en la cepa MRL/lpr ( $\bar{X}$   $2.52 \pm 1.09$ ) y C57BL/6 ( $\bar{X}$   $0.42 \pm 0.18$ ), ni en la IMF de pSTAT3 de ambas cepas ( MRL/lpr:  $\bar{X}$   $304 \pm 50.63$  y C57BL/6:  $\bar{X}$   $117.75 \pm 26.41$ ). Además, la IMF de pSTAT3 se encuentra incrementada *per se* en la cepa MRL/lpr respecto con la cepa C57BL/6 (Fig. 17).



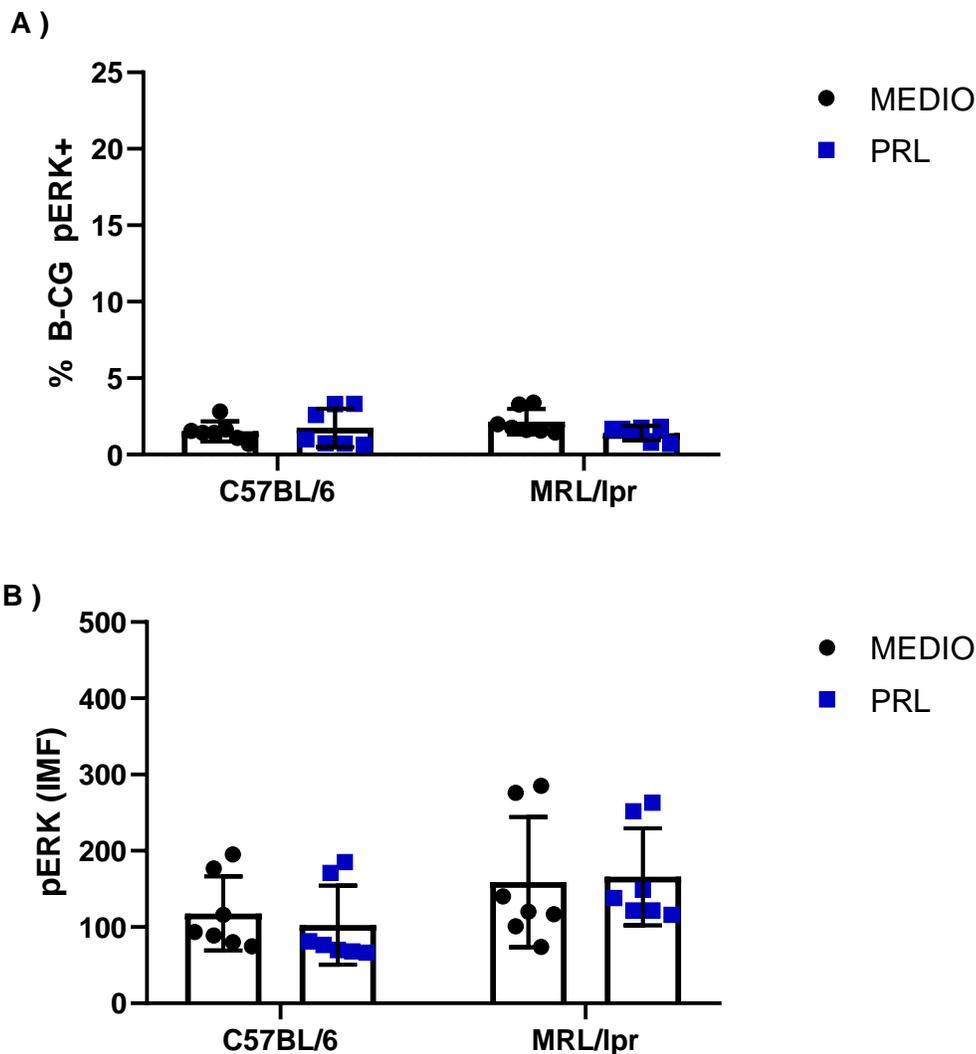
**Figura 17. Fosforilación de STAT3 en los linfocitos B-GC.** Linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* estimulados con PRL (50ng/mL). **A)** Porcentaje de B-GC pSTAT3+ **B)** IMF de pSTAT3; n=6.

La PRL tampoco incremento el porcentaje de B-GC pSTAT5+, de la cepa MRL/lpr ( $\bar{X}$  4.89  $\pm$  0.79) y C57BL/6 ( $\bar{X}$  0.42  $\pm$  0.09). Así como tampoco incrementó la IMF de pSTAT5 en ninguna de las cepas de ratón: MRL/lpr ( $\bar{X}$  340.66  $\pm$  42.54) y C57BL/6 ( $\bar{X}$  120.91  $\pm$  39.73). Además, tanto el porcentaje como la IMF de pSTAT5 se encuentra incrementada *per se* en la cepa MRL/lpr respecto con la cepa C57BL/6 (Fig. 18).

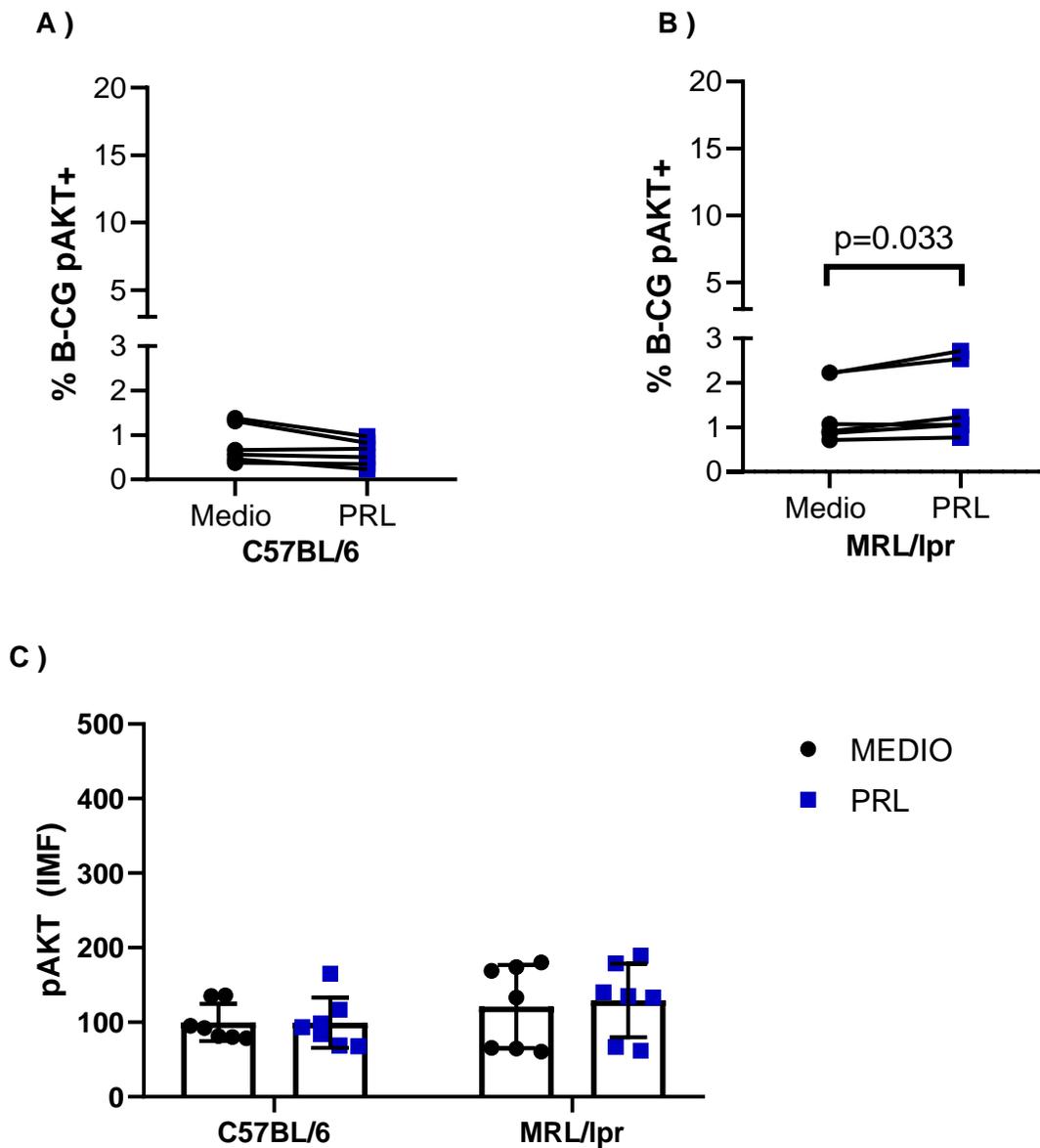


**Figura 18. Fosforilación de STAT5 en los linfocitos B-GC.** Linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* estimulados con PRL (50ng/mL). **A)** Porcentaje de B-GC pSTAT5+ **B)** IMF de pSTAT5; n=6.

Para determinar si la PRL se encontraba favoreciendo la vía de señalización de MAPK y PI3K-AKT en los linfocitos B-GC, se analizó la fosforilación de ERK y AKT en las cepas MRL/lpr y C57BL/6. La PRL no incrementó el porcentaje de los linfocitos B-GC pERK+ [(C57BL/6 ( $\bar{X}$   $1.75 \pm 1.26$ ) y MRL/lpr ( $\bar{X}$   $1.41 \pm 0.47$ )], ni la IMF de pERK [(C57BL/6 ( $\bar{X}$   $102.61 \pm 51.91$ ) y MRL/lpr ( $\bar{X}$   $166 \pm 63.57$ )] (Fig.19). Sin embargo, si se observó un incremento de linfocitos B-GC pAKT+ en la cepa MRL/lpr ante el estímulo de PRL ( $\bar{X}$   $1.56 \pm 0.84$ ;  $p=0.033$ ), contrario a la cepa control C57BL/6 ( $\bar{X}$   $0.59 \pm 0.28$ ) donde no se observó algún efecto a través de PRL. No obstante, no se observó un incremento en la IMF de pAKT de la cepa MRL/lpr ( $\bar{X}$   $116.03 \pm 60.68$ ) (Fig. 20). Por lo tanto, los resultados obtenidos estarían sugiriendo que la PRL señala a través de la isoforma larga de su receptor por STAT1 en los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* de ratones que tienden a desarrollar LES, la cepa MRL/lpr. También, es probable que la PRL señalice en menor medida por la isoforma larga a través de AKT o bien, mediante la isoforma corta en los linfocitos B-GC de ratones que tienden a desarrollar LES.



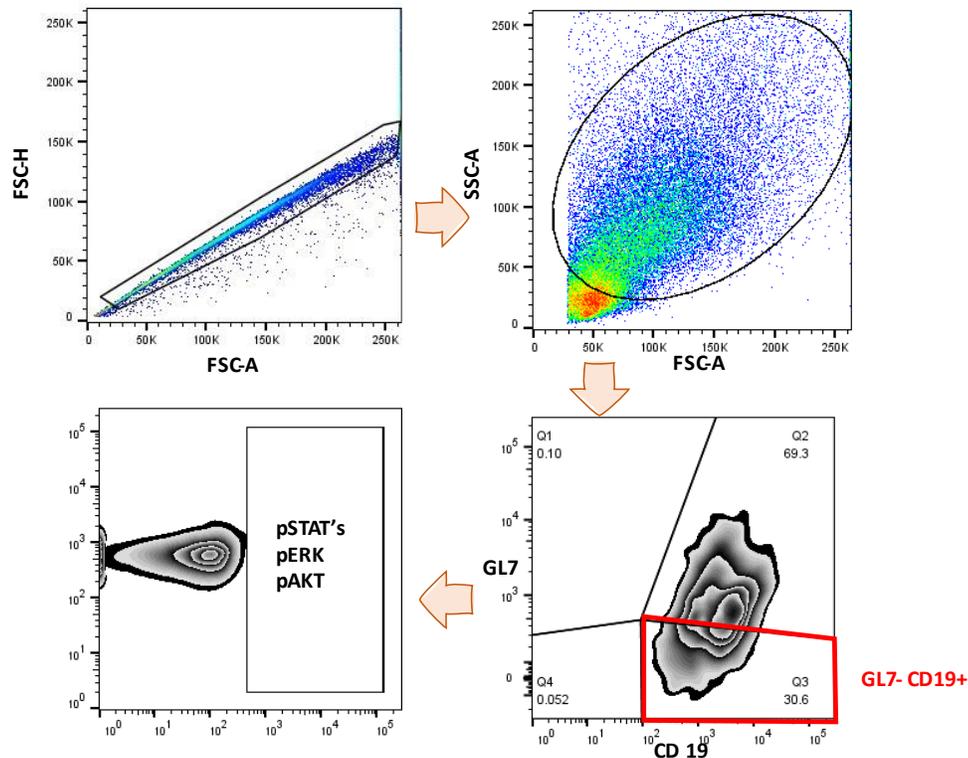
**Figura 19. Fosforilación de ERK en los linfocitos B-GC.** Linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* estimulados con PRL (50ng/mL). **A)** Porcentaje de B-GC pERK+ **B)** IMF de pERK; n= 7.



**Figura 20. Fosforilación de AKT en los linfocitos B-GC.** Linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* estimulados con PRL (50ng/mL). **A-B)** Porcentaje de B-GC pAKT+ **C)** IMF de pAKT; n= 7.

## La PRL no señala en linfocitos que no son B-GC

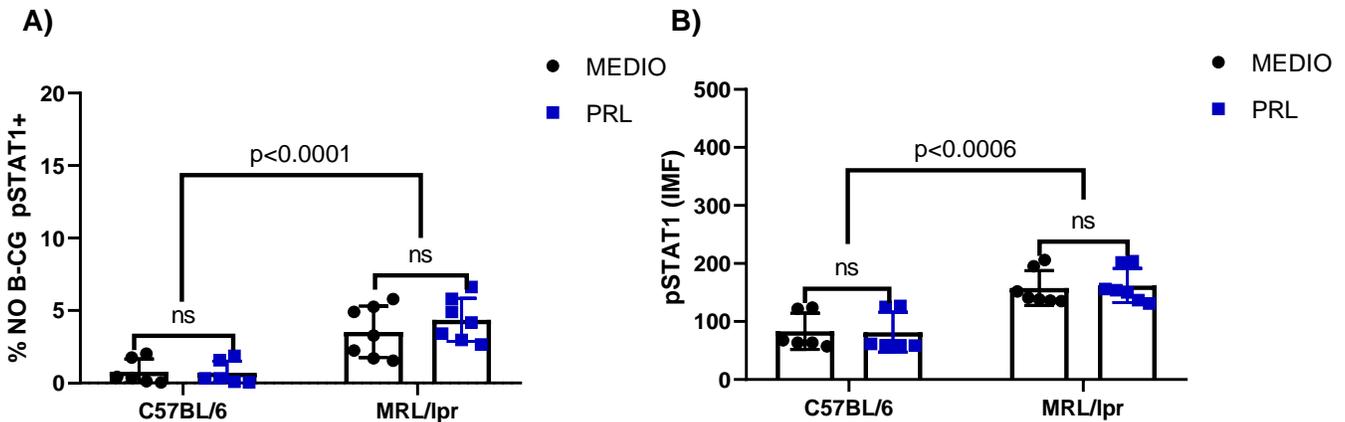
Ya que se identificó la señalización de PRL en la población de linfocitos B-GC en los ensayos *in vitro*, se decidió analizar la señalización en la población de aquellos linfocitos que no llegaron a diferenciarse. La población fue seleccionada de los mismos experimentos de linfocitos de ratones C57BL/6 y MRL/lpr. La estrategia de análisis utilizada para citometría de flujo se observa en la figura 21, en donde se eligió la población que no alcanzó a diferenciarse a linfocitos B-GC.



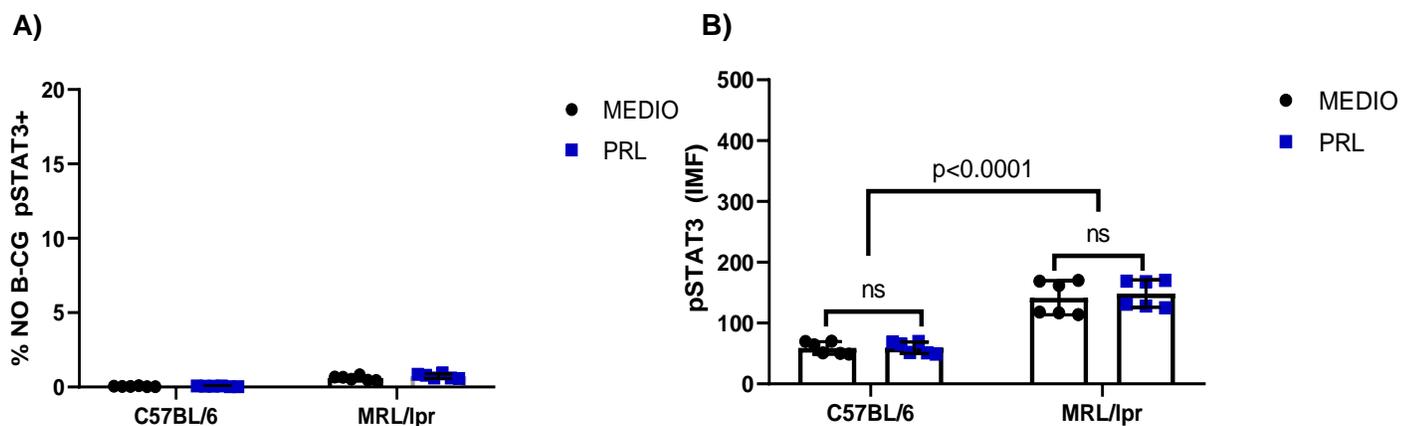
**Figura 21. Estrategia de análisis de linfocitos que no son B-GC.** Se tomaron los eventos sencillos, posteriormente por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A) se seleccionó la región de linfocitos y de ahí la región para los linfocitos que no son B-GC de acuerdo con el fenotipo GL7- CD19+ (recuadro rojo). De la región de linfocitos CD19+GL7- se determinó la fosforilación de STAT1, STAT3, STAT5, ERK y AKT.

En la población de linfocitos GL7- CD19+, no se observaron cambios estadísticamente significativos inducidos por la PRL en el porcentaje de linfocitos positivos para la fosforilación de STAT1, STAT3, STAT5, ERK y AKT, tanto en la cepa **C57BL/6** (pSTAT1:  $\bar{X}$  0.70  $\pm$  0.80; pSTAT3: 0.05  $\pm$  0.02; pSTAT5 : 0.07  $\pm$  0.03; pERK: 0.65  $\pm$  0.44; pAKT: 0.07  $\pm$  0.06 ), como en la cepa **MRL/lpr** (pSTAT1:  $\bar{X}$  4.36  $\pm$  1.48; pSTAT3: 0.73  $\pm$  0.15; pSTAT5: 2.41  $\pm$  1.69; pERK: 1.51  $\pm$  1.10; pAKT: 1.55  $\pm$  1.38 ).

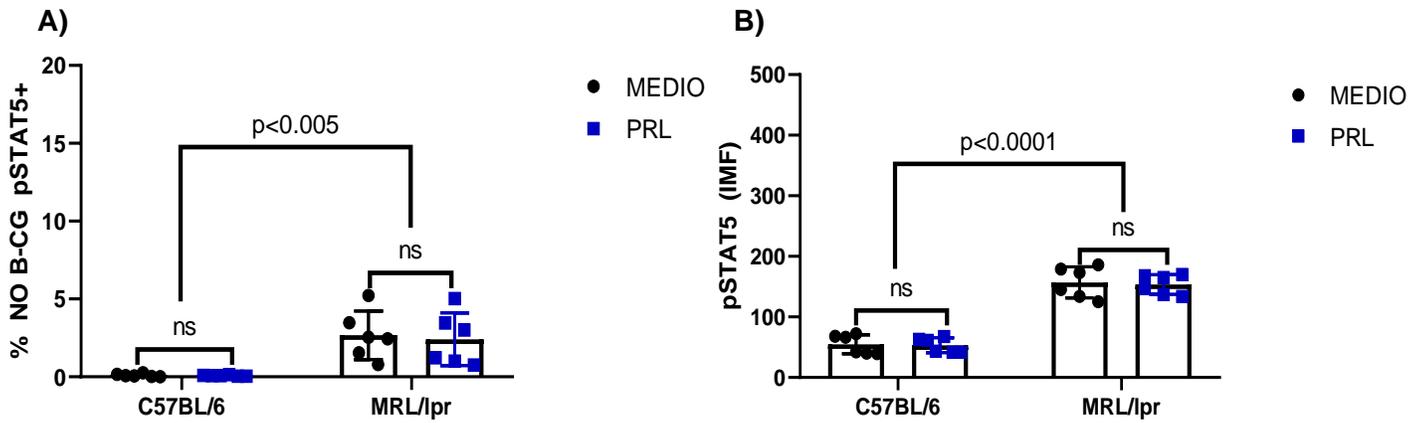
Tampoco se identificaron alteraciones por PRL en la IMF de la fosforilación de las proteínas en la cepa **C57BL/6** [STAT1 ( $\bar{X}$  81.6  $\pm$  34.41), STAT3 ( $\bar{X}$  59.33  $\pm$  9.57), STAT5 ( $\bar{X}$  53.31  $\pm$  12.15), ERK ( $\bar{X}$  41  $\pm$  12.48), AKT ( $\bar{X}$  46.18  $\pm$  5.10)] y en la cepa **MRL/lpr** [STAT1 (162  $\pm$  29.42), STAT3 (148.5  $\pm$  22.54), STAT5 (153.5  $\pm$  16.18), ERK (93.11  $\pm$  33.05), AKT (67.71  $\pm$  24.33)] (Figs. 22-26). Se sugiere que la PRL se encuentra señalizando solamente en aquellos linfocitos que completaron su diferenciación a B-GC.



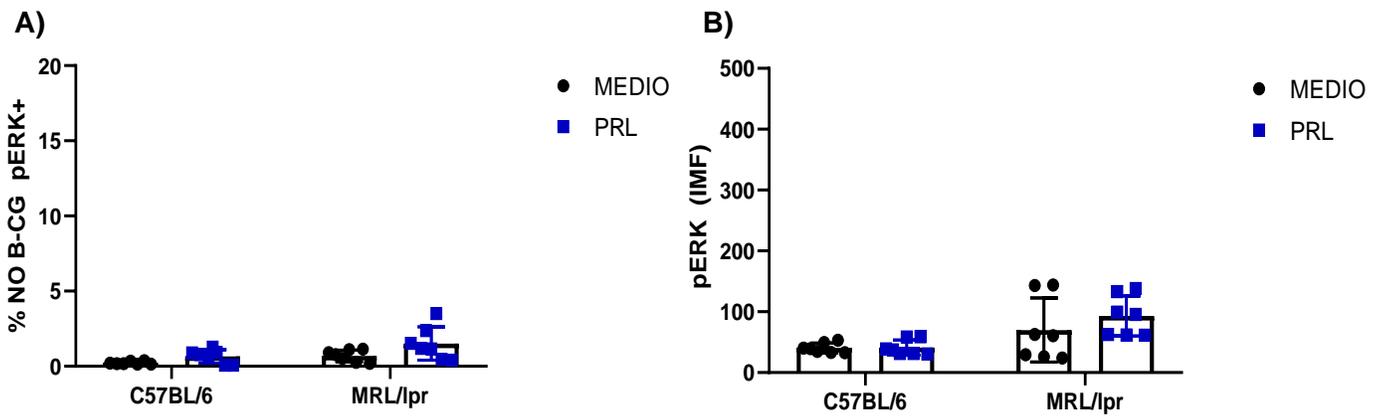
**Figura 22. Fosforilación de STAT1 en linfocitos que no son B-GC. A)** Linfocitos pSTAT1+. **B)** IMF de pSTAT1. C57BL/6 : n= 6; MRL/lpr: n=7.



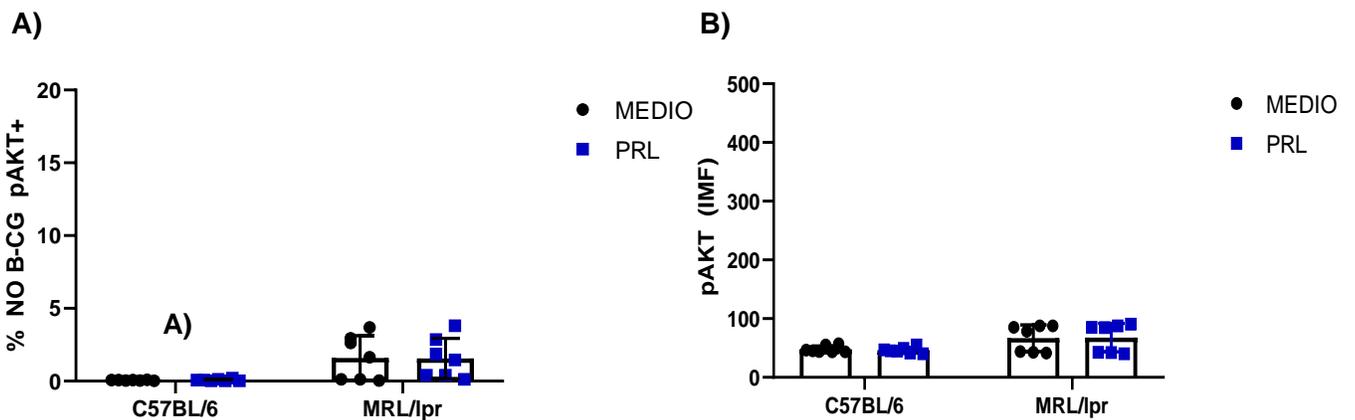
**Figura 23. Fosforilación de STAT3 en linfocitos que no son B-GC. A)** Linfocitos pSTAT3+ **B)** IMF de pSTAT3. n=6.



**Figura 24. Fosforilación de STAT5 en linfocitos que no son B-GC. A) Linfocitos pSTAT5+ B) IMF de pSTAT5. n=6**



**Figura 25. Fosforilación de ERK en linfocitos que no son B-GC. A) Linfocitos pERK+ B) IMF de pERK. n= 7.**



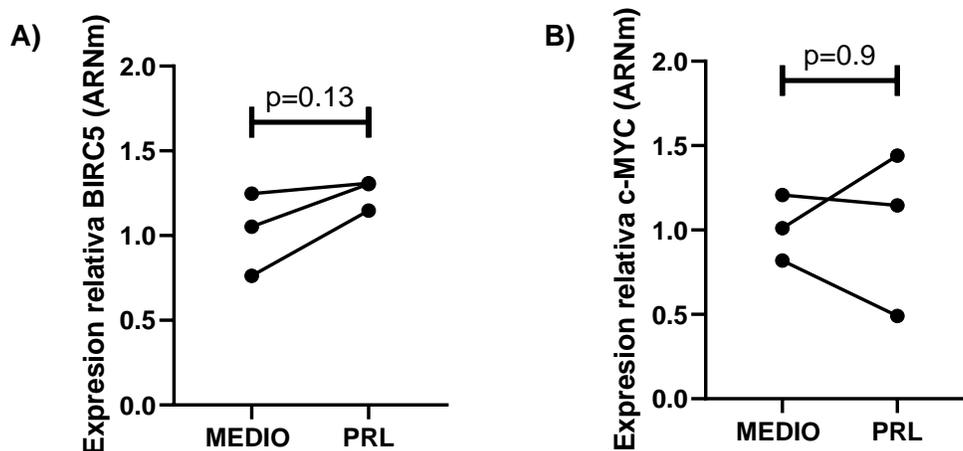
**Figura 26. Fosforilación de AKT en linfocitos que no son B-GC. A) Linfocitos pAKT+ B) IMF de pAKT. n= 7.**

## Determinación génica inducida por la señalización de PRL en los linfocitos B-GC

Para identificar aquellos genes que se encuentren expresados mediante el estímulo de PRL, se utilizaron linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* durante 48 horas con o sin PRL, o estimulados al término de las 48 horas durante 30 minutos. Se utilizaron ratones de la cepa MRL/lpr que tiende a presentar síntomas similares al LES.

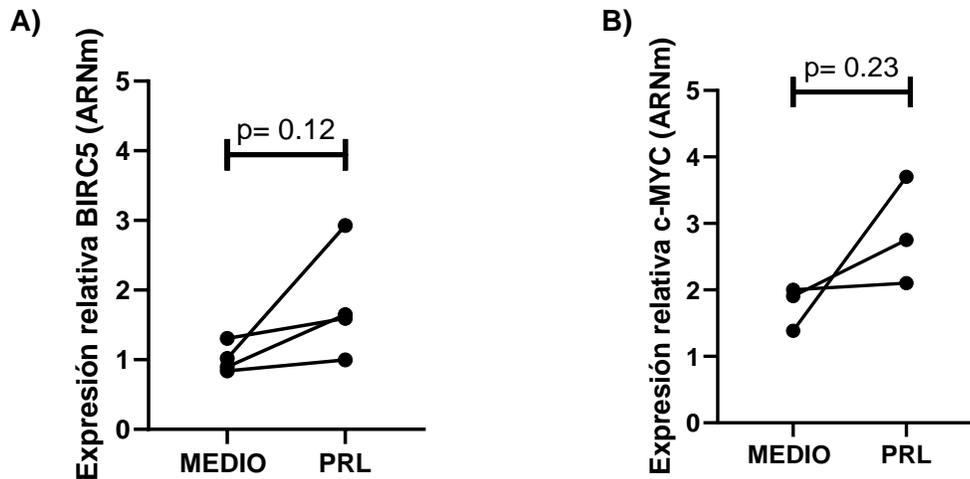
Se propuso analizar la expresión relativa de algunos genes involucrados en procesos celulares de los linfocitos B-GC y que probablemente se encuentran incrementados por la PRL a través de la señalización de STAT1 y AKT en el LES, como: c-myc y Birc5.

Los resultados no indicaron una diferencia significativa en los linfocitos diferenciados a B-GC que se incubaron durante 30 minutos con PRL. La estadística en la expresión relativa de Birc5 tuvo una  $p=0.13$ , mientras que c-myc contó con una  $p=0.9$  (Fig. 27). En los linfocitos que se diferenciaron durante 48 horas con o sin la presencia de PRL, tampoco hubo efecto sobre la expresión relativa de Birc5 ( $p=0.12$ ) y c-myc ( $p=0.22$ ) (Fig. 28). Por lo cual será importante identificar otros posibles candidatos involucrados en la proliferación del linfocito B-GC a través de la señalización de STAT1.



**Figura 27. La PRL no incrementa la expresión relativa de Birc5 y c-myc en los linfocitos B-GC posterior a las 48 h de diferenciación.**

Se diferenciaron linfocitos B totales de ratones MRL/lpr. Los linfocitos B-GC diferenciados se estimularon con PRL durante 30 minutos y se realizó RT-PCR tiempo real para determinar la expresión relativa de: A) Birc5 y B) c-myc.



**Figura 28. La PRL no incrementa la expresión relativa de Birc5 y c-myc durante la diferenciación de los linfocitos B-GC.**

Se diferenciaron linfocitos B totales de ratones MRL/lpr. Los linfocitos B-GC diferenciados, se estimularon con PRL durante las 48 horas de diferenciación. Se realizó RT-PCR tiempo real para determinar la expresión relativa de: A) Birc5 y B) c-myc.

### Los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* producen PRL

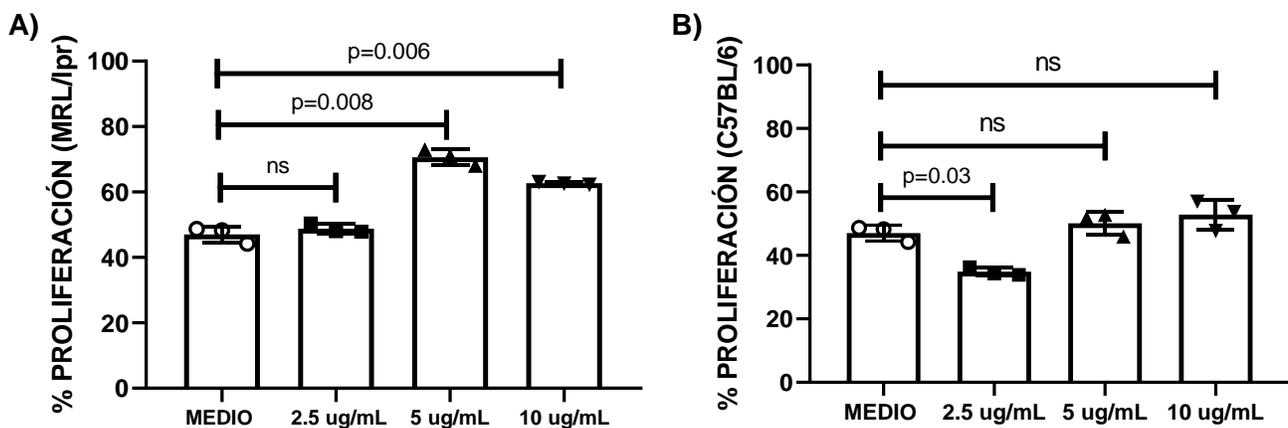
En nuestro grupo de trabajo se identificó previamente que la PRL no tiene efecto en la diferenciación de linfocitos B-GC con condiciones óptimas de anti-IgM y anti-CD40 (5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), es decir condiciones ya reportadas (Nakanishi et al., 1996). Sin embargo, al inducir la diferenciación con concentraciones subóptimas previamente estandarizadas, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD40 y anti-IgM, se identificó un incremento en el porcentaje de linfocitos B-GC estimulados con PRL de los ratones MRL/lpr, en comparación con los linfocitos diferenciados en ausencia de PRL y de los ratones de la cepa C57BL/6. Por lo cual se decidió probar si este efecto se debe a que los linfocitos B-GC diferenciados con condiciones óptimas se encuentran produciendo PRL de *ново* que impida observar el efecto de la PRL exógena.

Para ello se analizó la bioactividad similar a la PRL recombinante mediante los sobrenadantes de los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* en ausencia de PRL, para identificar indirectamente con la proliferación de las células Nb2-11 teñidas con CFSE, si los linfocitos B-GC estarían produciendo PRL. Se utilizaron sobrenadantes de linfocitos B-GC diferenciados durante 48 horas con 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-IgM y anti-CD40.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el porcentaje de proliferación de las células Nb2-11 cuando se incubaron con sobrenadantes de linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr

diferenciados con concentraciones óptimas de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $70.63 \pm 2.47$ ) y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $62.66 \pm 0.40$ ) de anti IgM y CD40, respecto a las células incubadas solamente con medio ( $47.06 \pm 2.49$ ). Con una concentración subóptima de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $48.76 \pm 1.41$ ) no se identificó diferencia significativa (Fig.29A).

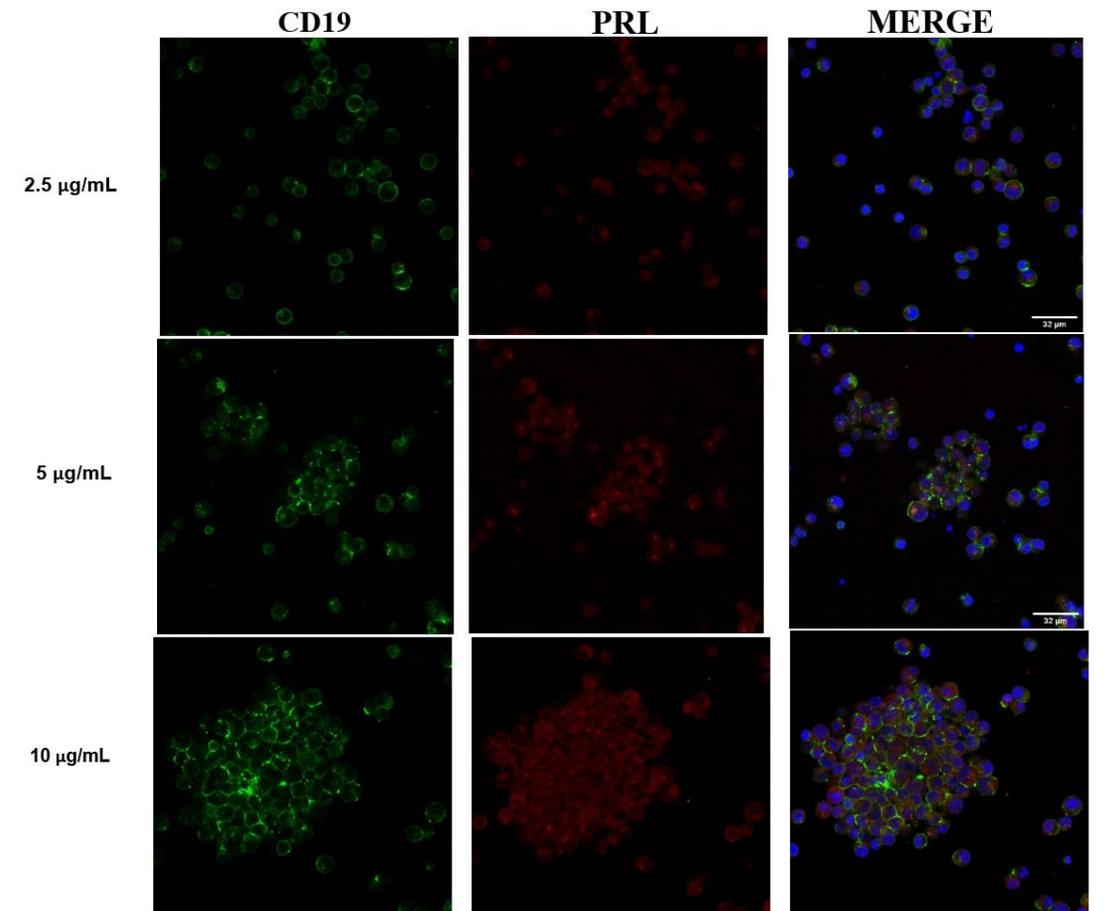
Las células Nb2-11 incubadas con sobrenadantes de linfocitos B-GC de ratones C57BL/6 no mostraron un incremento significativo a concentraciones óptimas: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgM y CD40 ( $50.13 \pm 3.69$ ) y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgM y CD40 ( $52.86 \pm 4.67$ ), respecto a las células incubadas con medio ( $47.06 \pm 2.49$ ). Sin embargo, se identificó un menor porcentaje de proliferación cuando las células se incubaron con sobrenadantes con una concentración de IgM y CD40 de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $34.83 \pm 1.28$ ) (Fig.29B).



**Figura 29. Cuantificación de la PRL producida por los linfocitos B-GC.**

Las células Nb2-11 se tiñeron con 1  $\mu\text{M}$  de CFSE y se incubaron 72 hrs con sobrenadantes de linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* con anti-IgM y anti-CD40 con concentraciones de 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ratones C57BL/6 y MRL/lpr. **A)** Porcentaje de proliferación con sobrenadantes de ratones MRL/lpr **B)** Porcentaje de proliferación con sobrenadantes de ratones C57BL/6. ; n=3.

Posteriormente se decidió comprobar de manera directa a través de la tinción por inmunofluorescencias la presencia de PRL en los linfocitos B-GC diferenciados con 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-IgM y anti-CD40. Identificando la presencia de PRL en las tres condiciones de diferenciación, ya que tal y como se observa en la figura 30, la PRL se localiza en el citoplasma y colocaliza con el marcador membranal CD19, específico para linfocitos B, y con el marcador nuclear.



**Figura 30. Producción de PRL en los linfocitos B-GC.** Se diferenciaron linfocitos B de bazo de ratones MRL/lpr a linfocitos B-GC con concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg/mL de anti-IgM y anti-CD40. Se observa la colocalización de la fluorescencia de anti-CD19 (verde), anti-PRL (rojo) y núcleos (azul).

## DISCUSIÓN

---

Las alteraciones en el sistema inmune y endocrino contribuyen al desarrollo de autoinmunidad (Borba et al., 2018). Se ha identificado una correlación sérica de PRL con el incremento de las manifestaciones clínicas del LES (Karimifar et al., 2013). Así como alteraciones en la función de los linfocitos T y la producción de anticuerpos en los linfocitos B (Cai et al., 2017; Legorreta-Haquet et al., 2013). En LES se ha evidenciado la presencia de clonas autorreactivas (células B 9G4) capaces de llevar a cabo la reacción del CG (Cappione et al., 2005). En este contexto, resulta de gran interés el estudio de los linfocitos Tfh y B-GC, encargados de la formación de los CGs donde se lleva a cabo la producción de anticuerpos. No obstante, aún no está claro cómo se encuentra interrelacionada la PRL con ambos tipos celulares en el LES, por lo que en la presente tesis se decidió investigar la señalización que se está favoreciendo a través de un modelo de ratón, la cepa MRL/lpr, que desarrolla una enfermedad similar al LES.

Se analizó la bioactividad adecuada de la PRL recombinante de ratón en la línea celular Nb2-11, ya que estos linfocitos pre-T tienden a depender de la PRL para un correcto crecimiento celular (Cox et al., 1989; Tanaka et al., 1980). Con el bioensayo realizado para la proliferación de células Nb2-11 con la PRL recombinante, se identificó la replicación celular de estas células de una manera dependiente de la dosis. Por lo cual, se indicó indirectamente que la hormona se encontraba en perfecto estado para dar pauta a los experimentos del trabajo experimental.

Se ha señalado que la fosforilación del R-PRL y de las proteínas asociadas al receptor, desencadenan una serie de transducción de señales y eventos de proliferación dependiendo de la concentración de la PRL (Lebrun et al., 1994). Anteriormente en mi grupo de trabajo se realizaron curvas dosis-respuesta de la PRL en los linfocitos T y B cultivados con distintos mitógenos y concentraciones de PRL para observar la proliferación inducida en células T y B de humano y ratón. Por lo tanto, la concentración de 50ng/mL se ha utilizado de manera óptima en un amplio repertorio de artículos publicados dentro de mi grupo de investigación. Concentración también utilizada en todo el proceso experimental de la presente tesis. Además, en nuestro laboratorio se ha observado que la concentración de 50ng/mL es óptima para la diferenciación de células B-GC, mientras que el incremento de dicha concentración (100 ng/mL) no otorga un efecto celular. Similar a lo que hemos observado, Tomio, A., et. al (2008) reportaron en linfocitos T que es hasta 100ng/mL de PRL que se reprime la expresión del factor de transcripción T-bet mediante JAK2 y STAT3.

Por otra parte, se ha descrito que la isoforma larga del R-PRL señala a través de las vías JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT, contrario a la isoforma corta que sólo señala a través de MAPK y PI3K-AKT (Bernard et al., 2019; Bole-Feysot et al., 1998). En los ratones que desarrollan LES la PRL incrementó la fosforilación de STAT3 en los linfocitos Tfh, mientras que en los linfocitos B-GC incrementó la fosforilación de STAT1 y en menor medida la fosforilación de AKT. Estos resultados en conjunto con lo ya reportado previamente en nuestro grupo de trabajo, donde se identificó que los linfocitos Tfh y B-GC de ratones MRL/lpr expresan la isoforma larga del R-PRL (Alemán, 2020; Carreon, 2019), estarían indicando que la PRL se encuentra señalizando principalmente a través de la isoforma larga de su receptor en ratones que desarrollan LES, no así en los ratones que no desarrollan la enfermedad. En la cepa C57BL/6, la PRL no tuvo efecto en la señalización de ninguna vía, probablemente se debió a que en estos ratones se ha reportado una menor expresión del R-PRL en los linfocitos B y en los linfocitos Tfh (Alemán, 2020; Legorreta-Haquet et al., 2013).

La activación de STAT3 se confirmó con un inhibidor no peptídico (Stattic), que impide la unión de motivos peptídicos fosforilados en la tirosina al dominio STAT3 SH2, inhibiendo selectivamente la activación, la dimerización y la translocación nuclear de STAT3 (Schust et al., 2006). Confirmando así que el efecto de la PRL es específico en la activación hacia STAT3 en los linfocitos Tfh de los ratones que desarrollan LES. También, se ha reportado que la deficiencia de STAT3 en linfocitos T disminuye la producción de autoanticuerpos ds-DNA y glomerulonefritis (Yoshida et al., 2019). Por lo que la señalización de PRL a través de STAT3 en los linfocitos Tfh probablemente se encuentra relacionada con la progresión del LES. Si bien no se analiza el efecto celular posterior a la inhibición de STAT3, se estaría confirmando que es la PRL quien induce la fosforilación de STAT3, pues con el inhibidor los niveles de pSTAT3 se mantienen igual que cuando las células se incuban sólo con medio.

Es probable que a través de STAT3 también se incremente la producción de citocinas de los linfocitos Tfh incrementando la respuesta de los CGs, ya que en estudios previos se encontró un incremento de IL-21 en los Tfh diferenciados con PRL (Alemán, 2020). Cabe recordar que IL-21, es una citocina vital para la maduración de la afinidad de anticuerpos (Song & Matthias, 2018).

Respecto a los linfocitos B-GC, anteriormente se identificó que la PRL salva de la apoptosis a los linfocitos B inmaduros a través de STAT3 en ratones MRL/lpr que desarrollan LES,

favoreciendo la sobrevida de linfocitos autorreactivos (Flores-Fernández et al., 2016, 2021). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que la PRL favorece la activación de la vía JAK-STAT1 en los linfocitos B-GC. Sugiriendo la versatilidad de la PRL en la señalización de cada tipo celular, como son los estadios de maduración de los linfocitos B. Tomando como referencia adicional que la PRL señala a través de STAT5 en las células epiteliales mamarias (Muthuswamy, 2012).

De acuerdo con lo anterior, nuestros datos coinciden con lo encontrado por Dong y colaboradores (2007), quienes reportan una correlación de STAT1 con el daño renal de los ratones MRL/lpr. Incluso, se ha reportado que en cultivos de fibroblastos y macrófagos, la PRL puede inducir la fosforilación de STAT1 y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Corbacho et al., 2003; Tripathi & Sodhi, 2008). También, en humanos se ha determinado el incremento de pSTAT1 en linfocitos totales de sangre periférica de pacientes con LES, en comparación con los linfocitos de individuos sanos (Aringer et al., 2005). Así como la correlación entre el incremento de STAT1 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B periféricos: B naive (CD20+CD27-), B de memoria (CD20+CD27+) y plasmablastos (CD20lowCD27high) y la actividad del LES (Aue et al., 2020).

Se ha reportado que la IL-6 es capaz de desencadenar la activación de STAT1 y de favorecer la diferenciación de los linfocitos Tfh (Choi et al., 2013; Twohig et al., 2019). En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que la PRL incrementa la IL-6 en los linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr (Carreón, 2019). Así que la PRL podría inducir la activación de la vía JAK-STAT1 indirectamente a través de una vía autocrina de IL-6 en los linfocitos B-GC. Asimismo, en 2018, Niu y colaboradores reportaron que pacientes con artritis reumatoide, otra enfermedad autoinmune, presentan concentraciones séricas elevadas de IL-6 que correlacionan con la expresión de pSTAT3 de los linfocitos Tfh de origen periférico. Así que la PRL podría estar incrementando la retroalimentación entre linfocitos Tfh y B-GC para la formación de los CGs en el LES, ya que la IL-6 producida en los linfocitos B-GC favorece la diferenciación de los linfocitos Tfh, a la vez que la IL-21 incrementada por PRL en los linfocitos Tfh estaría favoreciendo la diferenciación de los linfocitos B-GC.

Los CG pueden desarrollarse de manera espontánea en ausencia de inmunización o infección y se han detectado con mayor frecuencia en humanos y en modelos de ratón autoinmunes (Domeier et al., 2017; Luzina et al., 2001). Asimismo, se ha descrito que el IFN $\gamma$ , es capaz de

estimular la expresión, la fosforilación y la translocación al núcleo de Stat-1, lo que favorece la formación de CGs espontáneos y el desarrollo de células Tfh (Domeier et al., 2016). Entonces, la PRL también podría estar realizando un papel sinérgico con las citocinas que activan STAT1 y STAT3 en los linfocitos B-GC y Tfh.

Por otro lado, se ha reportado que la isoforma larga del R-PRL favorece la metástasis del cáncer de mama al promover la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células cancerosas, en las cuales también existe una mayor proporción de esta isoforma (Clevenger et al., 2003; Meng et al., 2004; Sa-nguanraksa et al., 2021). Por el contrario, la isoforma corta es un regulador negativo de la isoforma larga y se ha relacionado con procesos de diferenciación (Huang et al., 2008). Por lo que el incremento de los linfocitos B-GC pAKT+ podría ser resultado de la señalización de la isoforma larga del R-PRL, que si bien, no fue mayor que la activación de la vía JAK-STAT1, se ha descrito que las células B AKT<sup>-/-</sup> tienen una proliferación deficiente para el desarrollo de los CGs (Zhu et al., 2019).

Es relevante mencionar que los ratones MRL/lpr tienen una mutación en FAS<sup>lpr</sup> lo que los conlleva a desarrollar linfoproliferación, ya que el gen es importante en la apoptosis de células B y T. El modelo *per se* tiene sobreactivación de linfocitos lo que los conlleva a desarrollar esplenomegalia y distintas linfadenopatías, contrario a lo visto en el ratón control C57BL/6 (Richard & Gilkeson, 2018). Incluso en pacientes y modelos de ratón con LES se ha identificado que la señalización JAK/STAT se encuentra incrementada respecto a los individuos o ratones sanos (Alunno et al., 2019). Por lo tanto, no es de extrañar que la señalización de STATs es mayor en la cepa MRL/lpr, aún sin haber estimulado con PRL, pues el LES es una enfermedad multifactorial. No obstante, el efecto de la PRL en los resultados obtenidos de las células Tfh y B-GC nos estaría indicando que la hormona es importante para incrementar aún más el proceso del centro germinal que culmina con la formación de inmunocomplejos y daño renal.

Por otro lado, en los linfocitos B-GC la PRL no aumenta la supervivencia, pero sí incrementa la proliferación y el porcentaje de células plasmáticas (Carreon, 2019). Por lo tanto, se decidió analizar la expresión relativa de c-myc y Birc5, involucrados en la proliferación de los linfocitos B-GC. Se ha reportado que Birc5 es capaz de ejecutar las funciones de proliferación celular en los linfocitos B inmaduros (Flores-Fernández et al., 2021). Birc5 pertenece a la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP) y puede actuar como gen anti-apoptótico o favorecer la

progresión del ciclo celular (Gil-Kulik et al., 2019; Flores-Fernández et al., 2016). Mientras que c-myc se ha descrito como un regulador de la proliferación en la línea celular W53, a través de la señalización de AKT y la inducción de PRL (Domínguez-Cáceres et al., 2004). Así como un regulador de la expansión de los linfocitos B-GC (Ramezani-Rad et al., 2020). Sin embargo, al no encontrar diferencia estadística, será necesario incrementar los experimentos hasta obtener resultados concluyentes que nos ayuden a dilucidar la expresión génica con la que se encuentra actuando la PRL a través de STAT1 y/o AKT en el linfocito B-GC, o bien, proponer nuevos candidatos involucrados en su proliferación o diferenciación hacia células productoras de anticuerpos.

En reportes previos de nuestro grupo de trabajo, se diferenciaron linfocitos B-GC con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-IgM y anti-CD40, moléculas utilizadas para simular la activación con un linfocito T y que se garantice la activación y diferenciación del linfocito B. Se encontró que, solo con dosis subóptimas (2.5 µg/mL) de los anticuerpos utilizados, es posible apreciar una mejor diferenciación del linfocito B-GC cuando se estimula con PRL, contrario a los resultados observados con dosis óptimas ya reportadas (5 µg/mL y 10 µg/mL). Al realizar el bioensayo de las células Nb2-11 con los sobrenadantes recolectados de los linfocitos B-GC diferenciados sin PRL y junto con las imágenes de inmunofluorescencia, se identificó que los linfocitos B-GC producen PRL. Los datos reportados por Carreón (2019), podrían ser el resultado de que los linfocitos B-GC diferenciados con dosis óptimas producen mayor cantidad de PRL, por lo cual se sugiere que no es posible observar el efecto de la PRL sintética incorporada a los cultivos. Además, los linfocitos B-GC de los ratones MRL/lpr podrían estar produciendo una mayor cantidad de PRL que los de la cepa control, ya que en el bioensayo de las células Nb2-11 con sobrenadantes de linfocitos de los ratones C57BL/6, no incrementó la proliferación de las células Nb2-11 al mismo grado que con sobrenadantes de los ratones que desarrollan LES (Fig.29B), por lo que queda claro que existe una relación entre la PRL y la autoinmunidad. Este resultado se debería confirmar con un inhibidor de PRL previo a la incorporación de los sobrenadantes, ya que las células Nb2 pueden proliferar también con la hormona del crecimiento. Sin embargo se ha demostrado que la hormona del crecimiento revierte los efectos autoinmunes al mantener la actividad de células T supresoras y limitar la diferenciación a linajes T proinflamatorios (Villares et al., 2013). Por lo tanto, se podría considerar una menor producción de hormona del crecimiento en los ratones MRL/lpr predispuestos a desarrollar una enfermedad autoinmune. Por otra parte, se estaría

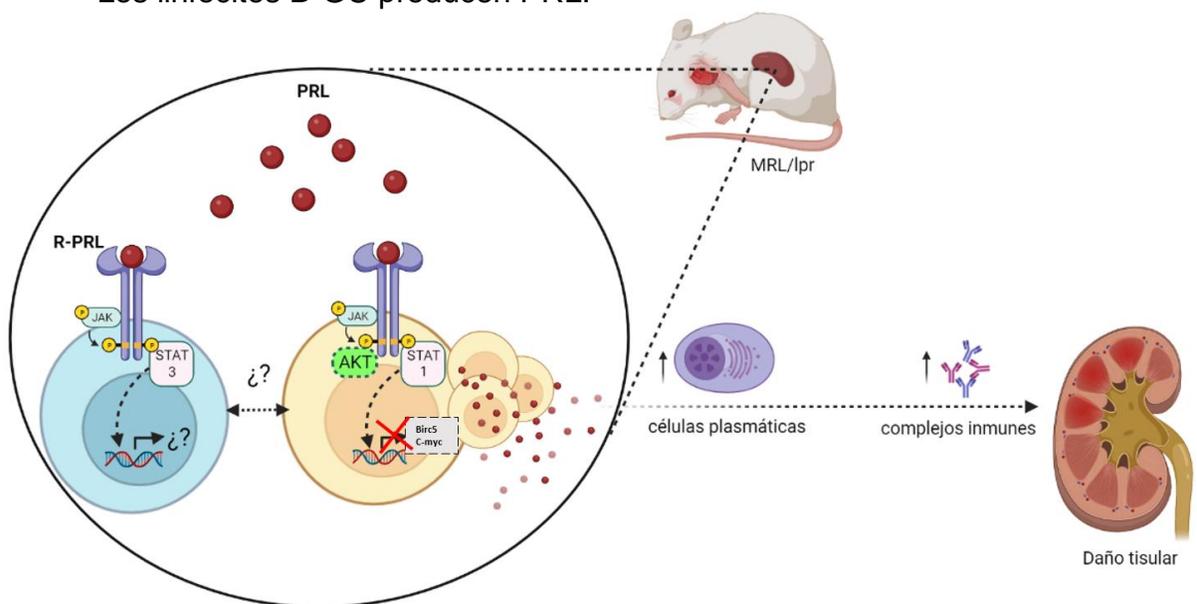
confirmando que el efecto en la señalización de los linfocitos B-GC (diferenciados con dosis subóptimas), realmente se debe a la incorporación de la PRL sintética y no son producto de la PRL endógena de los linfocitos utilizados.

De acuerdo con lo anterior, se sabe poco sobre los mecanismos reguladores que controlan la expresión de PRL en sitios extrahipofisarios, así como el papel que desempeña la PRL extrapituitaria durante la fisiología normal (Muthuswamy, 2012). Sin embargo, a diferencia de las células lactotropas de la hipófisis que tienen una mayor capacidad para almacenar PRL sintetizada, es probable que la PRL extrapituitaria esté regulada al nivel de la transcripción y no al nivel de liberación de los depósitos vacuolares, ya que de acuerdo con Gerlo (2006), la transcripción del ARNm de PRL sintetizado en sitios extrahipofisarios está regulada por un promotor alternativo e inicia 5.8 kb río arriba del sitio de iniciación utilizado en las células lactotropas.

Está claro que los efectos de la PRL, en la proliferación, apoptosis y diferenciación dependerán del contexto celular, incluyendo las condiciones del microambiente y la isoforma del receptor mediante la cual señala. En el LES será relevante identificar la expresión génica inducida por la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC a través de STAT3 y STAT1 respectivamente, para poder completar el mecanismo con el que se encuentra involucrada en los procesos celulares, moleculares y fisiológicos del LES y la respuesta inmune humoral, en la formación del centro germinal y su consecuente diferenciación a células productoras de autoanticuerpos culpables de la inflamación y progresión de las manifestaciones clínicas de dicha autoinmunidad.

## CONCLUSIONES

- La PRL señala a través de STAT3 en los linfocitos Tfh de los ratones MRL/lpr propensos a desarrollar LES.
- Los linfocitos B-GC diferenciados *in vitro* expresan principalmente la isoforma larga del R-PRL.
- La PRL señala a través de STAT1 y en menor medida a través de AKT en los linfocitos B-GC de los ratones MRL/lpr propensos a desarrollar LES.
- La PRL no incrementa la expresión de Birc5 y c-myc en los linfocitos B-GC.
- Los linfocitos B-GC producen PRL.



**Fig.31. Efecto de la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC diferenciados *in vitro* de ratones MRL/lpr.** La PRL actúa en los linfocitos Tfh y B-GC a través de la isoforma larga de su receptor. La PRL señala a través de STAT3 en los linfocitos Tfh y por STAT1 y en menor medida por AKT en los linfocitos B-GC. Además, la PRL puede ser producida por los linfocitos B-GC. Sin embargo, sigue sin identificarse la expresión génica que se encuentra induciendo la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC que favorezca los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la producción de células plasmáticas productoras de autoanticuerpos responsables de incrementar las manifestaciones clínicas del LES.

## PERSPECTIVAS

---

- En el futuro, será conveniente analizar de manera *ex vivo* la señalización inducida por la PRL en linfocitos B-GC de ratones MRL/lpr de 15-18 semanas, periodo en el que se presentan las manifestaciones del LES. Así como determinar la expresión génica inducida por la PRL en los linfocitos Tfh y B-GC. Además, será conveniente realizar co-cultivos para analizar el efecto de la PRL entre la interacción de los linfocitos Tfh y B-GC.

## REFERENCIAS

---

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). *Inmunología Celular y Molecular* (8a ed.). Elsevier.
- Al-Chalabi, M., Bass, A. N., & Alsalman, I. (2021). Physiology, Prolactin. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507829/>
- Alemán, Y. P. (2020). *Participación del receptor de prolactina en la formación de centros germinales para la producción de anticuerpos en ratones que desarrollan lupus. (Tesis de Maestría)*. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Alemán-García, Y. P., Vaquero-García, R. M., Flores-Fernández, R., Fuentes-Pananá, E. M., Gorcica-Rosete, P., Pizaña-Venegas, A., Chávez-Sánchez, L., Blanco-Favela, F., Legorreta-Haquet, M. V., & Chávez-Rueda, A. K. (2021). Prolactin Increases the Frequency of Follicular T Helper Cells with Enhanced IL21 Secretion and OX40 Expression in Lupus-Prone MRL/lpr Mice. *Journal of Immunology Research*, 2021, 6630715. <https://doi.org/10.1155/2021/6630715>
- Allen, C. D. C., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, 27(2), 190-202. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>
- Alunno, A., Padjen, I., Fanouriakis, A., & Boumpas, D. T. (2019). Pathogenic and Therapeutic Relevance of JAK/STAT Signaling in Systemic Lupus Erythematosus: Integration of Distinct Inflammatory Pathways and the Prospect of Their Inhibition with an Oral Agent. *Cells*, 8(8), 898. <https://doi.org/10.3390/cells8080898>
- Aringer, M., Karonitsch, T., Steiner, C., Feierl, E., Steiner, G., & Smolen, J. (2005). Stat1 and phosphorylated Stat1 are increased in lymphocytes and monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 7(1), P133. <https://doi.org/10.1186/ar1654>
- Aue, A., Szelinski, F., Weißenberg, S. Y., Wiedemann, A., Rose, T., Lino, A. C., & Dörner, T. (2020). Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology*, 59(11), 3435-3442. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa187>
- Aurrand-Lions, M., & Mancini, S. J. C. (2018). Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082353>
- Bernard, V., Young, J., & Binart, N. (2019). Prolactin—A pleiotropic factor in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(6), 6. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
- Bernard, V., Young, J., Chanson, P., & Binart, N. (2015). New insights in prolactin: Pathological implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(5), 5. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>
- Binart, N., Bachelot, A., & Bouilly, J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(6), 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.008>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225-268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Borba, V. V., Zandman-Goddard, G., & Shoenfeld, Y. (2018). Prolactin and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00073>

- Cai, Z., Xie, C., Qiao, W., Fei, X., Guo, X., Liu, H., Li, X., Fang, X., Xu, G., Dou, H., & Deng, G.-M. (2017). The Role of Estrogen Membrane Receptor (G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1) in Skin Inflammation Induced by Systemic Lupus Erythematosus Serum IgG. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01723>
- Cano, R. L. E., & Lopera, H. D. E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes. En *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*. El Rosario University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>
- Cappione, A., Anolik, J. H., Pugh-Bernard, A., Barnard, J., Dutcher, P., Silverman, G., & Sanz, I. (2005). Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3205-3216. <https://doi.org/10.1172/JCI24179>
- Carreon, R. (2019). *Papel del receptor de prolactina en la diferenciación de células plasmáticas y secreción de anticuerpos en un modelo de lupus eritematoso sistémico (Tesis de Maestría)*. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C., & Crotty, S. (2013). Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3049-3053. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203032>
- Clevenger, C. V., FURTH, P. A., HANKINSON, S. E., & SCHULER, L. A. (2003). The Role of Prolactin in Mammary Carcinoma. *Endocrine reviews*, 24(1), 1-27. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0036>
- Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Eiserich, J. P., Cross, C. E., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2003). Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Letters*, 544(1-3), 171-175. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00499-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00499-x)
- Cox, J. H., Lamb, J. R., Bal, V., Butcher, G. W., Howard, J. C., Owen, M. J., & Ivanyi, J. (1989). The phenotypic and molecular characterization of Nb2 lymphoma cells activated with IL-2 and human growth hormone. *Immunology*, 66(1), 83-89.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4), 529-542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
- Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*, 50(5), 1132-1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>
- Davis, J. A., & Linzer, D. I. H. (1989). Expression of Multiple Forms of the Prolactin Receptor in Mouse Liver. *Molecular Endocrinology*, 3(4), 674-680. <https://doi.org/10.1210/mend-3-4-674>
- Domeier, P. P., Chodisetti, S. B., Soni, C., Schell, S. L., Elias, M. J., Wong, E. B., Cooper, T. K., Kitamura, D., & Rahman, Z. S. M. (2016). IFN- $\gamma$  receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 715-732. <https://doi.org/10.1084/jem.20151722>
- Domeier, P. P., Schell, S. L., & Rahman, Z. S. M. (2017). Spontaneous Germinal Centers and Autoimmunity. *Autoimmunity*, 50(1), 4-18. <https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1280671>
- Domínguez-Cáceres, M. A., García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., González-Parque, P., León, J., & Martín-Pérez, J. (2004). *Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208002>
- Dong, J., Wang, Q.-X., Zhou, C.-Y., Ma, X.-F., & Zhang, Y.-C. (2007). Activación de la vía de señalización STAT1 en nefritis lúpica en ratones MRL / lpr. *Lupus*, 16(2), 101-109. <https://doi.org/10.1177/0961203306075383>
- Fatoye, F., Gebrye, T., & Svenson, L. W. (2018). Real-world incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Alberta, Canada. *Rheumatology International*, 38(9), 1721-1726. <https://doi.org/10.1007/s00296-018-4091-4>
- Flores-Fernández, R., Aponte-López, A., Suárez-Arriaga, M. C., Gorocica-Rosete, P., Pizaña-Venegas, A., Chávez-Sánchez, L., Blanco-Favela, F., Fuentes-Pananá, E. M., & Chávez-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(2), 316. <https://doi.org/10.3390/cells10020316>

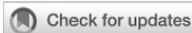
- Flores-Fernández, R., Blanco-Favela, F., Fuentes-Pananá, E. M., Chávez-Sánchez, L., Gorocica-Rosete, P., Pizaña-Venegas, A., & Chávez-Rueda, A. K. (2016). Prolactin Rescues Immature B-Cells from Apoptosis Induced by B-Cell Receptor Cross-Linking. *Journal of Immunology Research*, 2016, 3219017. <https://doi.org/10.1155/2016/3219017>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Gil-Kulik, P., Krzyżanowski, A., Dudzińska, E., Karwat, J., Chomik, P., Świstowska, M., Kondracka, A., Kwaśniewska, A., Cioch, M., Jojczuk, M., Nogalski, A., & Kocki, J. (2019, enero 10). *Potential Involvement of BIRC5 in Maintaining Pluripotency and Cell Differentiation of Human Stem Cells* [Research Article]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/8727925>
- Glimcher, L. H., & Singh, H. (1999). Transcription Factors in Lymphocyte Development—T and B Cells Get Together. *Cell*, 96(1), 13-23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80955-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80955-1)
- Gorvin, C. M. (2015). The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2(3), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2015.05.001>
- Huang, K., Ueda, E., Chen, Y., & Walker, A. M. (2008). Paradigm-shifters: Phosphorylated prolactin and short prolactin receptors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13(1), 69-79. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9072-x>
- Jara, L. J., Medina, G., Saavedra, M. A., Vera-Lastra, O., Torres-Aguilar, H., Navarro, C., Vazquez del Mercado, M., & Espinoza, L. R. (2017). Prolactin has a pathogenic role in systemic lupus erythematosus. *Immunologic Research*, 65(2), 512-523. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8891-x>
- Karimifar, M., Tahmasebi, A., Bonakdar, Z. S., & Purajam, S. (2013). Correlation of serum prolactin levels and disease activity in systematic lupus erythematosus. *Rheumatology International*, 33(2), 511-516. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2211-5>
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., & Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>
- Kenneth Murphy, Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunobiología de JANEWAY* (7a ed.). McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
- Kim, S. J., Lee, K., & Diamond, B. (2018). Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01793>
- Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 22-33. <https://doi.org/10.1038/nri2217>
- Leaños-Miranda, A., Pascoe-Lira, D., Chávez-Rueda, K. A., & Blanco-Favela, F. (2001). Antiprolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus: Frequency and correlation with prolactinemia and disease activity. *The Journal of Rheumatology*, 28(7), 1546-1553.
- Lebrun, J. J., Ali, S., Sofer, L., Ullrich, A., & Kelly, P. A. (1994). Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 14021-14026.
- Legorreta-Haquet, M. V., Flores-Fernández, R., Blanco-Favela, F., Fuentes-Pananá, E. M., Chávez-Sánchez, L., Hernández-González, R., Tesoro-Cruz, E., Arriaga-Pizano, L., & Chávez-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. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/287469>
- Li, W., Titov, A. A., & Morel, L. (2017). An update on lupus animal models. *Current opinion in rheumatology*, 29(5), 434-441. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000412>
- Lisnevskaja, L., Murphy, G., & Isenberg, D. (2014). Systemic lupus erythematosus. *The Lancet*, 384(9957), 1878-1888. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60128-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60128-8)
- Luzina, I. G., Atamas, S. P., Storrer, C. E., daSilva, L. C., Kelsoe, G., Papadimitriou, J. C., & Handwerker, B. S. (2001). Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(4), 578-584.

- Maidhof, W., & Hilas, O. (2012). Lupus: An Overview of the Disease And Management Options. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(4), 240-249.
- Manson, J. J., & Rahman, A. (2006). Systemic lupus erythematosus. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1, 6. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-6>
- McMurray, R. W. (2001). Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 10(10), 742-747. <https://doi.org/10.1191/096120301717164985>
- Meda, F., Folci, M., Baccarelli, A., & Selmi, C. (2011). The epigenetics of autoimmunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 8(3), 226-236. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.78>
- Meng, J., Tsai-Morris, C.-H., & Dufau, M. L. (2004). Human prolactin receptor variants in breast cancer: Low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Research*, 64(16), 5677-5682. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1019>
- Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. (2016). GERMINAL CENTER B CELL DYNAMICS. *Immunity*, 45(3), 471-482. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>
- Muthuswamy, S. K. (2012). Autocrine prolactin: An emerging market for homegrown (prolactin) despite the imports. *Genes & Development*, 26(20), 2253-2258. <https://doi.org/10.1101/gad.204636.112>
- Nakanishi, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Nishioka, Y., Nomura, J., Nishimura, Y., Sakaguchi, N., Yonehara, S., Higashino, K., & Shinka, S. (1996). IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *International Immunology*, 8(5), 791-798. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.791>
- Niu, Q., Huang, Z.-C., Wu, X.-J., Jin, Y.-X., An, Y.-F., Li, Y.-M., Xu, H., Yang, B., & Wang, L.-L. (2018). Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 20(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1690-0>
- Overgaard, N. H., Jung, J.-W., Steptoe, R. J., & Wells, J. W. (2015). CD4+/CD8+ double-positive T cells: More than just a developmental stage? *Journal of Leukocyte Biology*, 97(1), 31-38. <https://doi.org/10.1189/jlb.1RU0814-382>
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., & Jones, P. (2020). *KUBY. Inmunología (8a ed.)*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
- Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959-971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- Ramezani-Rad, P., Chen, C., Zhu, Z., & Rickert, R. C. (2020). Cyclin D3 Governs Clonal Expansion of Dark Zone Germinal Center B Cells. *Cell reports*, 33(7), 108403. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108403>
- Recalde, G., Moreno-Sosa, T., Yúdica, F., Quintero, C. A., Sánchez, M. B., Jahn, G. A., Kalergis, A. M., & Mackern-Oberti, J. P. (2018). Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 17(5), 504-512. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.03.006>
- Rees, F., Doherty, M., Grainge, M. J., Lanyon, P., & Zhang, W. (2017). The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: A systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology*, 56(11), 1945-1961. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex260>
- Rezaieyazdi, Z., & Hesamifard, A. (2006). Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatology International*, 26(11), 1036-1039. <https://doi.org/10.1007/s00296-006-0129-0>
- Richard, M. L., & Gilkeson, G. (2018). Mouse models of lupus: What they tell us and what they don't. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000199. <https://doi.org/10.1136/lupus-2016-000199>
- Sa-nguanraksa, D., Mitpakdi, K., Samarthai, N., Thumrongtaradol, T., & O-charoenrat, P. (2021). Expression of long-form prolactin receptor is associated with lower disease-free and overall survival in node-negative breast cancer patients. *Gland Surgery*, 10(1), 130-142. <https://doi.org/10.21037/gs-20-569>
- Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(7), 7. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>

- Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U., & Berg, T. (2006). Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry & Biology*, 13(11), 1235-1242. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.018>
- Sigvardsson, M. (2018). Molecular Regulation of Differentiation in Early B-Lymphocyte Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071928>
- Song, S., & Matthias, P. D. (2018). The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2026. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02026>
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Tanaka, T., Shiu, R. P., Gout, P. W., Beer, C. T., Noble, R. L., & Friesen, H. G. (1980). A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: Measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 51(5), 1058-1063. <https://doi.org/10.1210/jcem-51-5-1058>
- Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A., & Kragelund, B. B. (2005). Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology*, 351(4), 810-823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042>
- Tomio, A., Schust, D. J., Kawana, K., Yasugi, T., Kawana, Y., Mahalingaiah, S., Fujii, T., & Taketani, Y. (2008). Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology & Cell Biology*, 86(7), 616-621. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.29>
- Tripathi, A., & Sodhi, A. (2008). Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways. *International Immunology*, 20(3), 327-336. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm145>
- Twohig, J. P., Cardus Figueras, A., Andrews, R., Wiede, F., Cossins, B. C., Derrac Soria, A., Lewis, M. J., Townsend, M. J., Millrine, D., Li, J., Hill, D. G., Uceda Fernandez, J., Liu, X., Szomolay, B., Pepper, C. J., Taylor, P. R., Pitzalis, C., Tiganis, T., Williams, N. M., ... Jones, S. A. (2019). Activation of naïve CD4+ T cells re-tunes STAT1 signaling to deliver unique cytokine responses in memory CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 20(4), 458-470. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0350-0>
- Villares, R., Kakabadse, D., Juarranz, Y., Gomariz, R. P., Martínez-A, C., & Mellado, M. (2013). Growth hormone prevents the development of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), E4619-4627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314985110>
- Waldmann, H. (2014). Immunological Tolerance. En *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00116-1>
- Wu, H., Deng, Y., Zhao, M., Zhang, J., Zheng, M., Chen, G., Li, L., He, Z., & Lu, Q. (2018). Molecular Control of Follicular Helper T cell Development and Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2470. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02470>
- Yap, D. Y. H., & Chan, T. M. (2019). B Cell Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis—Role in Pathogenesis and Effect of Immunosuppressive Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6231. <https://doi.org/10.3390/ijms20246231>
- Yoshida, N., He, F., & Kyttaris, V. C. (2019). T cell-specific STAT3 deficiency abrogates lupus nephritis. *Lupus*, 28(12), 1468-1472. <https://doi.org/10.1177/0961203319877242>
- Zhang, Q., & Vignali, D. A. A. (2016). Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity*, 44(5), 1034-1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.017>
- Zhu, Z., Shukla, A., Ramezani-Rad, P., Apgar, J. R., & Rickert, R. C. (2019). The AKT isoforms 1 and 2 drive B cell fate decisions during the germinal center response. *Life Science Alliance*, 2(6), e201900506. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900506>

## ANEXO I: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA ACEPTADA

A la par del proyecto de maestría, colaboré en una revisión bibliográfica, misma en la que me encuentro como segundo autor. Hasta el momento de la escritura de tesis y antes de la presentación del examen profesional la revisión no había sido publicada, pero si aceptada por la revista *Frontiers in Immunology*.



### OPEN ACCESS

#### EDITED BY

Ruben Dario Motrich,  
Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Técnicas (CONICET),  
Argentina

#### REVIEWED BY

Ettore Silvagni,  
University of Ferrara, Italy  
Massimo Costanza,  
Fondazione IRCCS Istituto  
Neurologico Carlo Besta institution,  
Milan, Italy

#### \*CORRESPONDENCE

Adriana Karina Chávez-Rueda  
akarina\_chavez@yahoo.com.mx

#### SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Autoimmune and Autoinflammatory  
Disorders: Autoimmune Disorders,  
a section of the journal  
*Frontiers in Immunology*

RECEIVED 10 August 2022

ACCEPTED 13 October 2022

PUBLISHED 28 October 2022

#### CITATION

Legorreta-Haquet MV, Santana-  
Sánchez P, Chávez-Sánchez L and  
Chávez-Rueda AK (2022) The effect of  
prolactin on immune cell subsets  
involved in SLE pathogenesis.  
*Front. Immunol.* 13:1016427.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1016427

#### COPYRIGHT

© 2022 Legorreta-Haquet, Santana-  
Sánchez, Chávez-Sánchez and  
Chávez-Rueda. This is an open-access  
article distributed under the terms of  
the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution  
or reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# The effect of prolactin on immune cell subsets involved in SLE pathogenesis

Maria Victoria Legorreta-Haquet, Paola Santana-Sánchez,  
Luis Chávez-Sánchez and Adriana Karina Chávez-Rueda\*

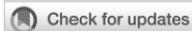
Unidad de Investigación Médica en Inmunología (UIM) en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro  
Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, Mexico

The higher frequency of autoimmune diseases in the female population compared to males suggests that certain hormones, such as prolactin (PRL), play a role in determining the prevalence of autoimmunity in women, particularly during childbearing age. PRL can act not only as a hormone but also as a cytokine, being able to modulate immune responses. Hyperprolactinemia has been implicated in the pathogenesis of various autoimmune diseases where it may affect disease activity. One of the conditions where PRL has such a role is systemic lupus erythematosus (SLE). PRL regulates the proliferation and survival of both lymphoid and myeloid cells. It also affects the selection of T-cell repertoires by influencing the thymic microenvironment. In autoimmune conditions, PRL interferes with the activity of regulatory T cells. It also influences B cell tolerance by lowering the activation threshold of anergic B cells. The production of CD40L and cytokines, such as interleukin IL-6, are also promoted by PRL. This, in turn, leads to the production of autoantibodies, one of the hallmarks of SLE. PRL increases the cytotoxic activity of T lymphocytes and the secretion of proinflammatory cytokines. The production of proinflammatory cytokines, particularly those belonging to the type 1 interferon (IFN) family, is part of the SLE characteristic genetic signature. PRL also participates in the maturation and differentiation of dendritic cells, promoting the presentation of autoantigens and high IFN $\alpha$  secretion. It also affects neutrophil function and the production of neutrophil traps. Macrophages and dendritic cells can also be affected by PRL, linking this molecule to the abnormal behavior of both innate and adaptive immune responses. This review aimed to highlight the importance of PRL and its actions on the cells of innate and adaptive immune responses. Additionally, by elucidating the role of PRL in SLE etiopathogenesis, this work will contribute to a better understanding of the factors involved in SLE development and regulation.

#### KEYWORDS

prolactin, SLE, immune cells, autoimmune disease, immune response

Los resultados presentados fueron de utilidad para la elaboración de un artículo experimental en el cual comparto la primer autoría. Hasta el momento de la escritura de tesis y antes de la presentación del examen profesional el artículo no había sido publicado, pero si aceptado por la revista *Frontiers in Immunology*.



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Ruben Dario Motrich,  
Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Técnicas (CONICET),  
Argentina

REVIEWED BY  
Anja Lux,  
University of Erlangen Nuremberg,  
Germany  
Rahul Pal,  
National Institute of Immunology (NII),  
India  
Qingjun Pan,  
Affiliated Hospital of Guangdong  
Medical University,

\*CORRESPONDENCE  
Adriana Karina Chávez-Rueda  
akarina\_chavez@yahoo.com.mx

**These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship**

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Autoimmune and Autoinflammatory  
Disorders : Autoimmune Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 11 August 2022  
ACCEPTED 11 October 2022  
PUBLISHED 25 October 2022

CITATION  
Carreón-Talavera R, Santana-  
Sánchez P, Fuentes-Pananá EM,  
Legorreta-Haquet MV, Chávez-  
Sánchez L, Gorocica-Rosete PS and  
Chávez-Rueda AK (2022) Prolactin  
promotes proliferation of germinal  
center B cells, formation of plasma  
cells, and elevated levels of IgG3 anti-  
dsDNA autoantibodies.  
*Front. Immunol.* 13:1017115.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1017115

# Prolactin promotes proliferation of germinal center B cells, formation of plasma cells, and elevated levels of IgG3 anti-dsDNA autoantibodies

Ricardo Carreón-Talavera<sup>1†</sup>, Paola Santana-Sánchez<sup>1†</sup>,  
Ezequiel Moisés Fuentes-Pananá<sup>2</sup>,  
María Victoria Legorreta-Haquet<sup>1</sup>, Luis Chávez-Sánchez<sup>1</sup>,  
Patricia Sofia Gorocica-Rosete<sup>3</sup> and  
Adriana Karina Chávez-Rueda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UIM en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, Mexico, <sup>2</sup>Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez, México City, Mexico, <sup>3</sup>Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", México City, Mexico

Systemic lupus erythematosus (SLE) mainly affects females at reproductive age, which has been associated with hormones, such as prolactin (PRL). Different studies suggest that PRL exacerbates the clinical manifestations of SLE both in patients and in mouse models (e.g., the MRL/lpr strain), increasing the production of autoantibodies, which can be deposited as immune complexes and trigger inflammation and damage to different tissues. The objective of this work was to explore the potential mechanisms by which PRL increases the concentration of self-reactive antibodies in the MRL/lpr SLE model. To this end, we determined the role of PRL on the activation and proliferation of germinal center B cells (B-GCs) and their differentiation into antibody-secreting cells (ASCs). We show that the absolute number and percentage of B-GCs were significantly increased by PRL *in vivo* or upon *in vitro* treatment with anti-IgM and anti-CD40 antibodies and PRL. The augmented B-GC numbers correlated with enhanced proliferation, but we did not observe enhanced expression of CD80 and CD86 activation markers or the BCL6 transcription factor, arguing against a more effective differentiation. Nevertheless, we observed enhanced phosphorylation of STAT1, secretion of IL-6, expression of IRF4, numbers of ASCs, and levels of IgG3 antibodies directed against dsDNA. Altogether, these results support the hypothesis that a PRL-mediated expansion of B-GCs yields more self-reactive ASCs, potentially explaining the pathogenic immune complexes that steadily lead to tissue damage during SLE.

## Introduction

The germinal centers (GCs) are located in the follicular zone of the secondary lymphoid organs. In the GCs, the isotype switching and somatic hypermutation are carried out, resulting in the terminal differentiation of memory B cells and high-affinity antibody-secreting cells (ASC), both important for protection against pathogens (1). GC deregulation contributes to the progression of autoimmune diseases. In mouse and human models with autoimmunity, the appearance of spontaneous GC has been identified, correlating with the presence of autoantibodies (2, 3). In addition, autoreactive clones (9G4-B cells) that evade GC checkpoints have been reported in systemic lupus erythematosus (SLE) (4).

SLE is a multifactorial, chronic, autoimmune disease characterized by an exacerbated immune response, mainly of B-cells, which explains the presence of autoantibodies directed Ro, La, and histones. These autoantibodies form immune complexes that often leave the circulation and are deposited in the kidney, skin, and brain, among other tissues, causing inflammation and tissue damage (5, 6). SLE predominantly affects women rather than men in a 9:1 ratio, especially young women of reproductive age (7, 8). The gender dimorphism of SLE is usually attributed to the fact that alterations in the immune-neuroendocrine system contribute to the development of autoimmunity, and therefore it is suggested that hormones, such as prolactin (PRL), modulate the immune response influencing the development of SLE (9, 10). Indeed, 15–33% of lupus patients have elevated levels of serum PRL that correlate with disease activity (11–13), and individuals with hyperprolactinemia have an increased prevalence of autoantibodies (especially anti-dsDNA) (14).

In model mice that develop SLE, it has been reported that elevated levels of PRL exacerbate the disease, correlating with the production of autoantibodies and elevated markers of kidney damage, such as increased proteinuria (15–17). PRL has different biological functions that depend on the interaction with its receptor, for which different isoforms have been described. In mice, four isoforms have been identified, one long and three short, with the long isoform signaling through JAK-STAT, MAPK, and PI3K-AKT and the short isoform only signaling through MAPK and PI3K-AKT (18, 19).

Our group has reported that the different stages of maturation of B cells in bone marrow (proB, preB, and immature) (15), and in the spleen (transitional, follicular [FO] and marginal zone [MZ]) express the PRL receptor (16), both in strains that do not develop SLE (C57BL/6) and in models affected by the disease (MRL/lpr). In addition, we identified that PRL influences the B-cell maturation process by rescuing immature autoreactive B cells from apoptosis (20, 21). However, the mechanism by which PRL may favor autoantibody production is unclear.

In this study, we assessed *in vivo* and *in vitro* the possible mechanisms by which PRL could influence the GC reaction and the differentiation of GC B cells (B-GCs) to favor the production of autoantibodies. We addressed the role of PRL in the activation, differentiation, and proliferation of B-GCs and found that PRL increased the absolute number and percentage of these cells in the MRL/lpr strain. The augmented B-GC percentage correlated with enhanced proliferation and enhanced levels of anti-dsDNA IgG3 antibodies and IL-6. We also observed a mostly exclusive expression of the long isoform of the PRL receptor and signaling through activated STAT1 and AKT in B-GCs. The augmented B-GCs favored the formation of more ASCs, probably explaining the levels of self-reactive antibodies.

## Materials and methods

### Mice

The Animal Care Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” and the Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, approved the experiments performed in this study (R-2021-3603-029 and R-2016-785-050). Mice were worked according to the NIH Guide for the Care, the guidelines established in Mexico (NOM-062-ZOO-1999) and Use of Laboratory Animals. The C57BL/6 mice were acquired from Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” (Mexico City, Mexico), and the MRL/lpr (MRL/MpJFASlpr) and MRL (MRL/MpJ) mice were acquired from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). All mice were provided sterile food and water *ad libitum*, and sheltered in pathogen-free facilities.

### Prolactin hormone

Highly purified recombinant mouse PRL (AFP-405C) was obtained from Dr A.F. Parlow, at the National Hormone and Peptide Program, Harborn UCLA Medical Center, CA, USA.

### Antibodies

For cell culture, the following antibodies were used: anti-CD40 (rat IgG2a clone FGK45.5) from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> goat polyclonal antibody from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). For cell staining, the following antibodies were used: anti-CD19 FITC (clone 1D3/CD19), anti-GL-7 Pacific Blue (clone GL7), anti-Ki-67 Alexa 488 (clone 16A8), anti-pSTAT1 PE (clone A15158B), anti-pSTAT3 PE (clone 13A3-1), anti-ERK1/2 PE (clone 6B8B69), and anti-IL-6 PE (clone MP5-

20F3) from BioLegend (San Diego, CA, USA), anti-CD19 PerCP-Cy5.5 (clone 1D3), and anti-CD21 APC (clone 7G6) from BD Biosciences (Mountain View, CA, USA), anti-CD138 PE (clone 30506), anti-CD23 PE-cyanine7 (clone B3B4) from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), anti-pSTAT5 PE (clone SRBCZX), anti-CD80 PE (clone 16-10A1), anti-CD86 PE (clone GL1), anti-BCL6 PE (clone BCL-DWN), and anti-IRF4 PE-Cy7 (clone 3E4) from eBioscience (San Diego, CA, USA), and anti-pAKT PE (clone REA359) from Miltenyi Biotec.

## Induction of hyperprolactinemia and evaluation of SLE manifestations

Eight-week-old C57BL/6 and MRL/lpr female mice were treated subcutaneously with (i) metoclopramide (200 µg, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 100 µL of PBS with five doses per week for six weeks. The control group received (ii) 100 µL of PBS or (iii) no treatment during the same period. Using reactive strips for urinalysis (Mission, San Diego, CA, USA) were used to measure the urinary protein levels

## Analysis of antibodies in serum

Serum samples were taken from mice at the beginning (eight weeks) and end (15 weeks) of the experiments and were stored at -35°C until anti-dsDNA (15), and anti-Histone (22) antibodies were analyzed by ELISA as follows. A MaxiSorp plate (Nunc, Rochester, NY, USA) from 96-well was coated with 2.5 µg/ml calf thymus dsDNA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) or 10 µg/ml calf thymus histone (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) in 100 µl of bicarbonate buffer overnight at 4°C. Bovine serum albumin (BSA, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) at 2% was used to block the plate. The plate was incubated for one hour at 37°C with serum (1:50) or the anti-dsDNA antibody standard (clone 16-13, Chemicon International, Billerica MA, USA) or was incubated for two hours at room temperature with serum (1:150) for anti-histone antibody. The plate was washed and incubated with rabbit anti-mouse IgM, IgG, IgG1, or IgG2a conjugated to alkaline phosphatase (AP, Zymed Laboratories, San Francisco CA, USA) or anti IgG2b or IgG3 conjugated to peroxidase (HRP), after which substrate was added. (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; Sigma–Aldrich, St Louis MO, USA) for AP or HRP substrate (3,3',5,5' tetramethylbenzidine TMB Sigma–Aldrich), respectively. The O.D. was read at 405 or 450 nm using a Dynatech MR5000 ELISA reader.

## B-cell purification

B cells were purified by negative selection, for which eight-week-old female mice were euthanized. Spleen cells were

collected with cold RPMI (Gibco, Grand Island, NY, USA). The erythrocytes were eliminated using lysis buffer (Sigma–Aldrich), and the splenocytes were incubated with anti-CD43 (Ly-48) antibody conjugated with magnetic beads (Miltenyi Biotec). The cells went through a MACS LD separation column (Miltenyi Biotec). A >96% purity was determined through flow cytometry.

## Cell sorting

Purified B cells from spleen from eight-week-old female (for FO cell) or from 15-week-old female (for B-GCs) MRL/lpr mice were incubated with Ghost Red marker from Tonbo Biosciences (San Diego, CA, USA) and with the following antibodies specific for CD19, CD21, and CD23 (for FO cells) or CD19 and GL7 (for B-GC) in FACS buffer (PBS-BSA 0.5%) for 20 minutes at 4°C. The cells were washed, and FO or B-GC cells were sorted depending on the expression of CD19<sup>+</sup>CD21<sup>int</sup>CD23<sup>+</sup> or CD19+GL7+, using a FACSAria sorter (BD Bioscience). The purity of the sorted cells ranged from 95% to 98%.

## *In vitro* differentiation of germinal center B cells and antibody-secreting cells

For the *in vitro* differentiation studies, B cells from spleen were purified from female eight-week-old mice. B cells were cultured in serum-free TexMacs medium (Miltenyi Biotec) and stimulated with 2.5 µg/mL anti-IgM and 2.5 µg/mL anti-CD40 antibodies, with or without PRL (50 ng/mL). The culture was incubated for 48 h for the analysis of B-GCs and five days for ASCs at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

## Cell staining of germinal center B cells, survival, and antibody-secreting cells

Cells differentiated *in vitro* and primary cells isolated from mice with different treatments were stained with Ghost Red to analyze the percentage of living cells (Ghost Red neg) for 20 minutes at room temperature. Then the cells were stained with anti-GL7 and anti-CD19 antibodies (to identify B-GCs) and anti-CD19 and anti-CD138 antibodies (to identify ASCs) for 20 minutes at 4°C in the dark with FACS buffer. To measure cell activation, cells were incubated with anti-CD80 and anti-CD86 antibodies after 24 h of differentiation.

To stain BCL6, Ki67, and IRF4, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma–Aldrich) and permeabilized using Transcription Factor Staining Buffer (eBioscience, San Diego) for 2 h at 4°C, the cells were washed and staining with the antibodies. The samples were read using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec) and data were

analyzed with FlowJo 10 software (Tree Star, Ashland, OR USA). In all flow cytometry analyses, cell viability was assessed using the Ghost Red marker.

## Nb2 cell bioassay and determination of proliferation by CFSE

The rat lymphoma cell line (Nb2) was used to measure the PRL bioactivity as described by Tanaka et al. (23). Nb2 cells are of a pre-T cell origin and their proliferation is dependent on mammalian lactogens, such as prolactin. Cells were maintained in RPMI with 10% of FBS (fetal bovine serum, HyClone, Logan, UT, USA), 1% antibiotics (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% sodium pyruvate (HyClone), and 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Invitrogen) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the cells were washed and incubated with RPMI with 1% FBS for 24 h to synchronize the cell cycle. Increasing concentrations of recombinant mouse PRL in Tex Macs medium were added to Cell cycle resumption. The proliferation of Nb2 cells was analyzed with the CellTrace CFSE kit (carboxyfluorescein succinimidyl ester, Invitrogen).

PRL-like bioactivity was assessed with supernatants of B-GCs differentiated *in vitro* for 48 h with anti-IgM antibody (2.5, 5 or 10  $\mu$ g/mL) plus anti-CD40 (2.5  $\mu$ g/mL) antibody. We included controls without PRL. In these controls, cells were treated with medium or medium plus monoclonal antibody against PRL to block the PRL present in the supernatants.

Four million cells (B cells or Nb2 cells) were washed with PBS-BSA 0.1%, centrifuged, and stained with CFSE for 14 minutes at 37°C. Cells were washed three times with PBS-BSA to stop the reaction and placed on ice for 5 minutes.

B cells were counted and incubated for 48 h with different stimuli to favor formation of B-GC cells (anti-CD40, 2.5  $\mu$ g/mL, and anti-IgM, 2.5  $\mu$ g/mL, antibodies with or without 50 ng/mL of PRL). The proliferation index was obtained using the plugins from FlowJo "Proliferation Tool" Nb2 cells were incubated for 72 h with supernatants of B-GCs induced cells, as described above, the supernatants were pre-incubated with anti-PRL antibody. The samples were read using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer and the data were analyzed with FlowJo 10 software.

## Immunofluorescence staining of cells

*In vitro* differentiated B-GC cells with 2.5, 5, or 10  $\mu$ g/mL IgM and CD40 (2.5  $\mu$ g/mL) were used. Cells were placed directly onto loaded glass slides, fixed, and permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). Cells were incubated overnight with the following antibodies: biotinylated anti-mouse prolactin antibody from R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN, USA) and anti-CD19 FITC (clone 6D5) from Miltenyi

Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Subsequently, slides were incubated with the secondary antibody anti-rat IgG-AF488 (Jackson ImmunoResearch) and streptavidin APC (eBioscience) for 2 h. The slides were incubated with Hoechst (Invitrogen) for 10 minutes to stain the nuclei and were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA). Images were taken with a Nikon Ti Eclipse inverted confocal microscope (Nikon, ME, NY, USA) using NIS Elements v.4.50. Imaging was performed using a 20x objective lens (dry, NA 0.8). Images were analyzed using the FIJI ImageJ software.

## IL-6 concentration determination

IL-6 concentration determination was performed on the sera of experimental mice and on the supernatants of differentiated B-GCs at 48 h using the commercial assay The BD™ CBA Mouse IL-6 Flex Set (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, cat. 5622236). The samples were read using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer and data were analyzed with FlowJo 10 software.

## IL-6 secreting cells

B-GCs were differentiated *in vitro* as described above and then incubated for 5 h with Cell Stimulation Cocktail (cocktail of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin) and Protein Transport Inhibitor Cocktail (cocktail of Brefeldin A and Monensin) (eBioscience). The cells were washed, incubated with Ghost Red and with anti-GL7-Pacific Blue and anti-CD19-FITC antibodies at 4°C 20 minutes, followed by washing, fixing and permeabilizing with BD Cytotfix/Cytoperm. The cells were stained with an anti-IL-6 PE antibody (clone MP5-20F3). The samples were read using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer and data were analyzed with FlowJo 10 software.

## Quantification of IgG1, IgG2b, IgG3, and IgM antibodies in supernatants and serum

Antibody concentrations were determined by ELISA. A MaxiSorp plate (96-well) was sensitized with F(ab)<sub>2</sub> anti-IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA) at a concentration of 5  $\mu$ g/mL for IgM and with F(ab)<sub>2</sub> anti-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for IgG1, IgG2b, and IgG3 at a concentration of 2.5  $\mu$ g/mL in bicarbonate buffer overnight at 4°C. We used BSA-5% to block the plated. After washed, the plate was incubated with the IgM, IgG1, IgG2b, or IgG3 standards (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at different concentrations (0 ng/mL, 15.6 ng/mL, 31.2 ng/mL, 62.5 ng/mL, 125 ng/mL, and 250 ng/mL) and the cell culture

supernatants from cells differentiated for 5 days with or without PRL, or serum from mice with or without hyper-prolactinemia were added. The plate was incubated and washed; the conjugate and the specific substrates for each isotype were added. Plates were read at 405 or 450 nm using an ELISA reader.

## RT-PCR for PRL receptor isoforms

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to extract RNA from *in vitro* differentiated B-GCs or from *in vivo* B-GCs, according to the manufacturer's protocol. cDNA was generated using ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabs, MA, USA). Subsequently, for the expression of the different isoforms of PRL receptor, real-time PCR was performed using the following primers synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). As constitutive gene:  $\beta$ -actin 5'-GAGGAGGCTCTGGTTCAACA-3' (reverse) and 5'-CAGTAAATGCCACGAACGAA-3' (forward) was used. To determine the PRL receptor isoforms, the primers used were: long isoform 5'-GCTTGAGGAATCAGCCAAGA-3' (reverse) and 5'-AAAGCTGGCCAGATCTTTCTC-3' (forward) and short isoform 5'-GAGCACAAGAACAGGGGAAA-3' (reverse) and 5'-GGATGGTTTCACAATCCACA-3' (forward). The samples were analyzed in a LightCycler II thermocycler (Roche, Germany) using FastStart Essential DNA Green Master (Roche). With the following conditions: incubation at 95°C for 10 minutes and 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 8 s. Relative expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula. As a positive control of the expression of the short and the long isoforms of the PRL receptor, the 4T1 murine breast cancer cell line was used.

## Signaling pathway analysis

Differentiated B-GCs without PRL were allowed to settle for 8 h in basal medium. Subsequently, the cells were incubated with PRL for 30 minutes. The cells were fixed with 1x BD Phosflow Lyse/Fix Buffer 5x (BD Biosciences)/10 minutes, with BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences); the cells were permeabilized to determine intracellular STAT1 (anti-pSTAT1 PE, clone A15158B, BioLegend), STAT3 (anti-pSTAT3 PE, clone 13A3-1, BioLegend), and STAT5 (anti-pSTAT5 PE, clone SRBCZX, eBioscience) phosphorylation. To determine AKT (anti-pAKT PE, clone REA359, Miltenyi Biotec) and ERK1/2 (anti-pERK1/2 PE, clone 6B8B69, BioLegend) phosphorylation, cells were treated with IC Fixation Buffer (eBioscience) for 30 minutes at 4°C, washed with FACS buffer or Perm/Wash (BD Biosciences), and incubated with the antibodies for flow cytometric analysis for 30 minutes at 4°C. The samples were read using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer and the data were analyzed with FlowJo 10 software.

## Statistical analysis

The Shapiro–Wilks normality test was used to determine the distribution of the data, finding that the data presented a normal distribution ( $p > 0.05$ ). The results were analyzed according to the data distribution (mean and standard deviation). Dependent variables were compared using the paired Student's *t* test. We use one-way ANOVA and Tukey test as *post-hoc* when we compare three or more groups. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Statistical analysis of the data was performed with SPSS Statistics 27 software (IBM, Armonk, NY, USA).

## Results

### High levels of prolactin increase anti-dsDNA antibodies of the IgG3 isotype

The concentration of PRL in serum correlates with the levels of autoantibodies and SLE clinical manifestations in patients (13). Our group reported that treating MRL/lpr mice with metoclopramide increases PRL serum levels (15, 16). Thus, we treated MRL/lpr and control mice with metoclopramide or PBS or left them untreated (Figure 1A, Supplementary Figure 1). We confirmed our previously published data that treatment with metoclopramide increased PRL levels (untreated mice at 8 weeks,  $6.77 \pm 4.46$  ng/mL; untreated mice at 15 weeks,  $11.93 \pm 6.35$  ng/mL; PBS-treated mice at 15 weeks,  $14.94 \pm 5.12$  ng/mL; metoclopramide-treated mice at 15 weeks,  $27.73 \pm 5.07$  ng/mL), (Figure 1B). We observed an increase in proteinuria and in the concentration of anti-dsDNA ( $p < 0.001$ ) and anti-histones ( $p < 0.001$ ) IgG autoantibodies in the MRL/lpr strain treated with metoclopramide (Figures 1C–E). Although metoclopramide increased PRL in nonautoimmune C57BL/6 mice, no evidence of elevation of other SLE markers was observed (Supplementary Figures 1A, B). We found a positive correlation between the concentrations of anti-dsDNA and anti-histones antibodies of the IgG isotype and the concentration of PRL ( $r = 0.707$ ,  $p = 0.0001$ ;  $r = 0.782$ ,  $p = 0.0001$ ) (Figure 1F, Supplementary Figure 2A). Interestingly, we did not observe differences between the mice in the optical densities (O.D.) of the anti-dsDNA and anti-histones antibodies of the IgM isotype (Figure 1G, Supplementary Figure 2B), and no correlation was found between PRL and IgM anti-dsDNA antibody ( $r = -0.3449$ ,  $p = 0.07808$ ) (Figure 1H). When we determined the O.D. of the anti-dsDNA and anti-histones antibodies of the different IgG isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3), we found an increase in the O.D. only of the IgG3 isotype in mice with elevated PRL concentrations (treated with metoclopramide) (mice at 8 weeks, anti-dsDNA  $0.18 \pm 0.07$ , anti-histones  $0.24 \pm 0.09$ ; mice at 15 weeks, anti-dsDNA  $0.55 \pm 0.21$ , anti-histones  $0.40 \pm 0.09$ ; PBS

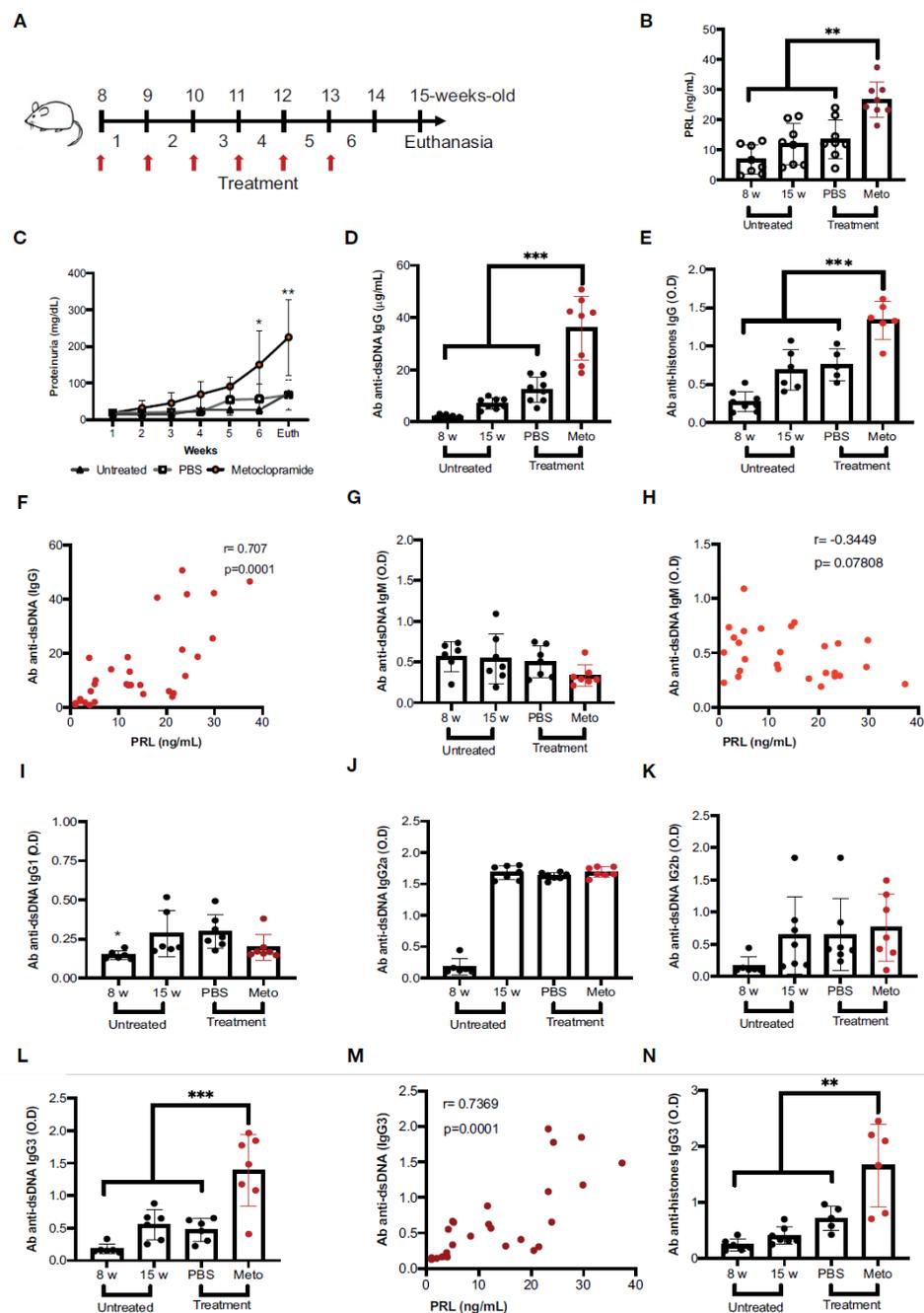


FIGURE 1

Prolactin correlates with increased levels of anti-dsDNA antibodies of the IgG3 isotype. Eight-week-old female MRL/lpr mice were treated subcutaneously with metoclopramide (meto, 200 µg) in 100 µL of PBS at five doses per week for six weeks. The control group was age and sex-paired mice that received 100 µL of PBS or no treatment during the same period. (A) Treatment strategy (flow chart). When the treatment was finished, the mice were sacrificed (Euth), after which the following parameters were measured. (B) The concentration of PRL by ELISA in mice with different treatments and in mice 8 weeks of age (statistical significant differences: Meto vs PBS  $p < 0.01$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.001$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). (C) The concentration of proteinuria using reactive strips for urinalysis (determined every week during treatment). (D) The concentration of IgG anti-dsDNA antibodies by ELISA (Meto vs PBS  $p < 0.001$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.001$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). (E) The concentration of IgG anti-histones antibodies by ELISA (Meto vs PBS  $p < 0.001$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.001$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). (F) The correlation between the serum concentrations of anti-dsDNA IgG antibody and PRL. The optical density (O.D.) of the other isotypes of anti-dsDNA antibodies was also determined by ELISA. (G) IgM Isotype, (H) correlation between PRL and the O.D. of anti-dsDNA IgM, (I) IgG1, (J) IgG2a, (K) IgG2b, and (L) IgG3 (statistical significant differences: Meto vs PBS  $p < 0.001$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.001$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). (M) Correlation between the concentrations of PRL and anti-dsDNA IgG3 antibody, and (N) IgG3 anti-histones (Meto vs PBS  $p < 0.01$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.001$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). Eight mice were used per condition. Pooled data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  using one-way ANOVA and Turkey's *post-hoc* test. Correlations were obtained using Pearson's correlation coefficient.

anti-dsDNA  $0.47 \pm 0.16$ , anti-histones  $0.71 \pm 0.09$ ; metoclopramide-treated mice, anti-dsDNA  $1.39 \pm 0.50$  ( $p < 0.001$ ), anti-histone  $1.77 \pm 0.80$  ( $p < 0.001$ ) (Figures 11-N, Supplementary Figure 2C-F). Again, these enhanced levels of IgG3 autoantibody correlated positively ( $r = 0.7369$ ,  $p = 0.0001$ ) with PRL concentrations (Figure 1M). We did not observe that metoclopramide treatment affected total immunoglobulin levels of IgM and IgG, only the concentration of the IgG3 increased (Supplementary Figures 2G-L). Thus, PRL increases IgG3, and this particular isotype seems responsible for DNA and histone self-reactivity and the potential for tissue damage.

## Elevated prolactin levels increase the absolute number of germinal center B cells and antibody-secreting cells

Since isotype switching occurs mainly in the GC, and PRL was found to correlate positively with anti-dsDNA IgG3 antibody, the absolute numbers of B-GCs (Figures 2A, B) and ASCs (CD138+IRF4+) (Figures 2C, D) were determined in mice (untreated, PBS-treated and metoclopramide-treated). We observed that the mice with the highest levels of PRL presented the highest absolute numbers of B-GCs ( $5.34 \pm 2.72 \times 10^6$  cells,  $p < 0.05$ ) and ASCs ( $7.00 \pm 3.11 \times 10^6$  cells,  $p < 0.05$ ). As expected, PBS-treated mice (B-GCs,  $2.84 \pm 1.60 \times 10^6$ ; ASCs,  $3.82 \pm 2.10 \times 10^6$  cells), and untreated 15-week-old mice ( $3.01 \pm 0.95 \times 10^6$ ;  $3.12 \pm 1.20 \times 10^6$  cells) had significantly more B-GCs and ASCs than 8-week-old mice ( $1.43 \pm 0.40 \times 10^6$  cells,  $p < 0.05$ ; and  $1.5 \pm 0.73 \times 10^6$  cells,  $p < 0.05$ ; respectively). The PRL serum levels correlated positively and significantly with the absolute numbers of B-GCs ( $r = 0.49$ ,  $p = 0.004$ ) and with ASCs ( $r = 0.65$ ,  $p = 0.0001$ ) (Figures 2E, F). We did not observe a metoclopramide/PRL effect on B-GCs and ASCs in control mice (C57BL/6) (Supplementary Figures 1C, D). These enhanced frequencies of B-GCs and ASCs induced by PRL are likely responsible for the high levels of self-reactive IgG3.

## Prolactin increases the proliferation of B-GCs

We determined whether PRL affects B-GC differentiation *in vitro* in MRL/lpr mice compared with C57BL/6 controls and included the MRL mouse strain, which is the parental strain for MRL/lpr. For this, we obtained splenic B cells from female 8-week-old mice in which there were no differences between the frequencies of developing B-GCs (Figure 3A). After purification, B cells were stimulated with anti-CD40 and anti-IgM antibodies and incubated with or without PRL (50 ng/mL). We found that the B cells from the MRL/lpr strain had a significant increase in the frequency of B-GCs ( $37.02 \pm 4.89\%$ ) compared with the MRL ( $25.91 \pm 6.65\%$ ;  $p < 0.01$ ) and C57BL/6 ( $14.61 \pm 4.89$ ;  $p < 0.001$ )

strains, which was also visualized by t-distributed stochastic neighbor-embedded (t-SNE) projections (Figures 3A, B) (24). Moreover, PRL further increased the percentage of B-GCs only in the MRL/lpr strain (without PRL,  $37.02 \pm 4.89\%$ ; with PRL,  $55.41 \pm 8.20\%$ ;  $p = 0.001$ ) (Figure 3A). This B-GC percentage increase was only observed when the MRL/lpr mouse B cells were incubated with suboptimal concentrations of anti-IgM (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and anti-CD40 (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) antibodies (Figure 3A).

The effect of PRL was not observed at higher concentrations of anti-IgM antibodies (5  $\mu\text{g/mL}$  and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figure 3C). This may be because B cells can secrete PRL, and this endogenous PRL could affect the effect of the exogenous PRL added to the cultures. Therefore, the presence of PRL in the B-GCs and in the supernatants of B cells incubated with a constant concentration of anti-CD40 antibody (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and with different concentrations of anti-IgM antibody was determined. We observed that B-GCs produced PRL by immunofluorescence staining (Figure 3D). To confirm that B-GC cells are secreting PRL, the presence of PRL in the supernatants of B cells was determined by measuring the percentage of Nb2 cell proliferation (cells that need PRL to proliferate). We found that the supernatant of the B cells incubated with a constant concentration of anti-CD40 (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and anti-IgM antibodies a different concentration (5 and 10  $\mu\text{g/mL}$ ), increased the proliferation of the Nb2 cells ( $63.00 \pm 7.76\%$ ,  $p < 0.001$  and  $59.03 \pm 3.66\%$ ,  $p < 0.01$ , respectively) compared with the supernatant of the cells incubated with the lowest anti-IgM tested (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ;  $45.58 \pm 3.29\%$ ). As a control for this assay, we used medium ( $43.11 \pm 4.23\%$ ) (Figures 3E, F). Also, the Nb2 proliferation decreased when the supernatant from B cells was pre-incubated with an antibody against PRL (IgM 5  $\mu\text{g/mL}$  =  $47.06 \pm 1.38$   $p < 0.001$ ; IgM 10  $\mu\text{g/mL}$  =  $42.10 \pm 0.40$   $p < 0.001$ ). These data suggest that PRL further exacerbates MRL/lpr mice, a strain already inclined to have an active B-GC differentiation pathway.

To establish the possible mechanism by which PRL increases the percentage of B-GCs, we determined the expression of the activation molecules CD80 and CD86 24 h after PRL stimulation. However, PRL did not affect the expression of these proteins (Figures 3G, H), suggesting that PRL does not increase B cell activation. We also determined whether PRL could promote differentiation into B-GCs by measuring the expression of BCL6, a transcription factor essential for the GC reaction and B-GC formation. We found that BCL6 expression was higher in the B-GCs of the mice that developed SLE compared with the control strains ( $p < 0.001$ ), further supporting that the B cells of the MRL/lpr strain are prone to form B-GCs (Figure 3I). Although, the expression of BCL6 measured through MFI did not increase (Figure 3I), the percentage of BCL6+ B-GC cells increased when the cells were differentiated with PRL (Figure 3J). Thus, we interpretate these data as PRL may not increase the B-GC cell differentiation, but that it may promote an alternative mechanism to increase the

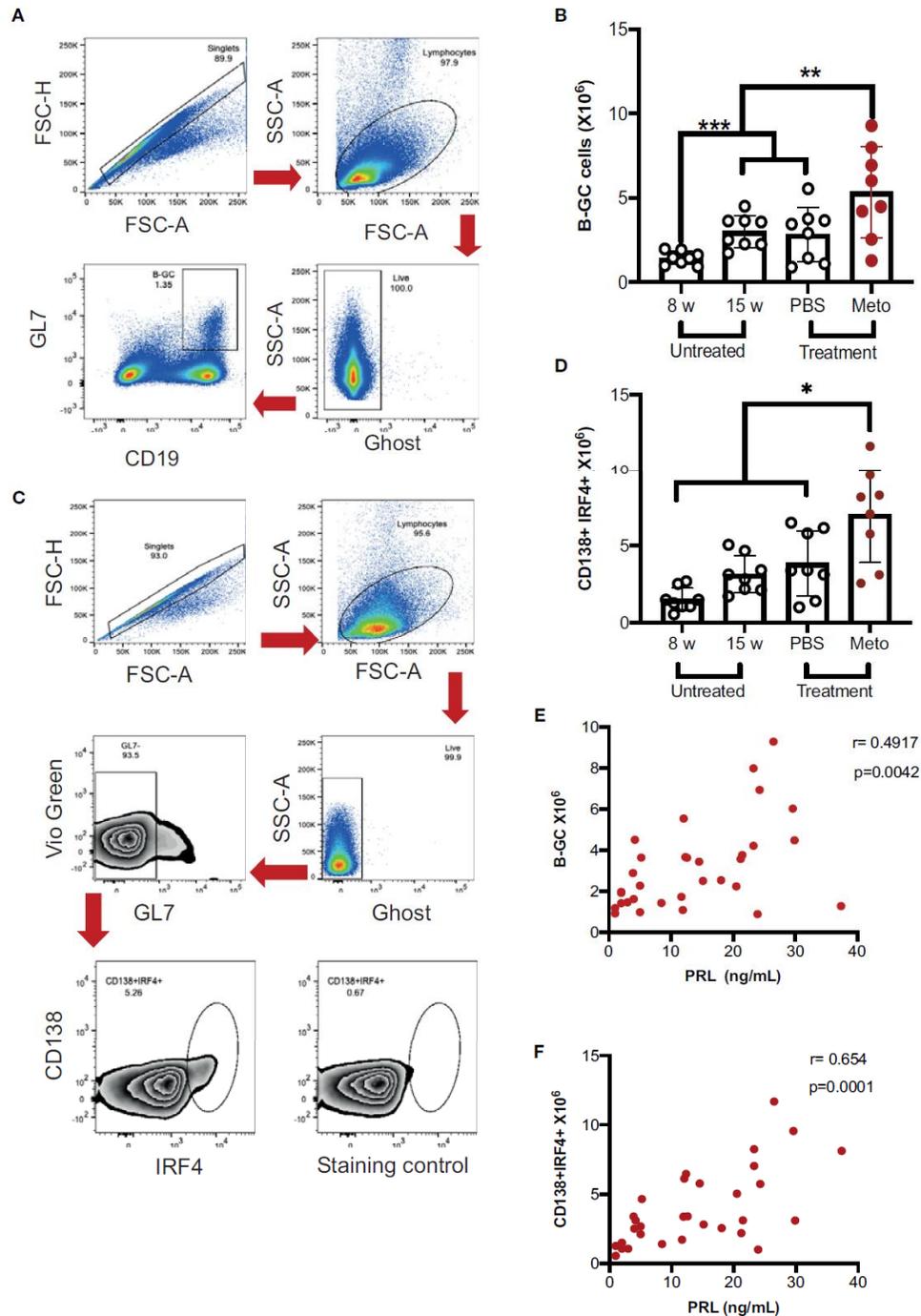


FIGURE 2

In MRL/lpr mice the increase in prolactin concentration correlates with the absolute number of germinal center B cells and antibody-secreting cells. Eight-week-old female MRL/lpr mice were treated subcutaneously with metoclopramide (meto) at five doses per week for six weeks, while the control group was age and sex-paired mice that received 100  $\mu$ L of PBS or no treatment during the same period. At the end of the treatment, cells were stained with Ghost Red-APC-Cy7 (cell viability) and antibodies against CD19-PerCP-Cy5.5, GL7-Pacific Blue, BCL6-PE, IRF4-PE-Cy7 and CD138-PE. **(A)** Flow cytometry analysis strategy to gate on B-GC cells, FSC-H  $\times$  FSC-A was used to excluded doublets; lymphocytes were gated on FSC-A  $\times$  SSC-A plot and live cells were gated in the Ghost Red negative. The CD19+GL7+ cells represent the B-GCs. **(B)** Absolute number of B-GCs (statistical significant differences: Meto vs PBS  $p < 0.05$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.05$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). **(C)** Flow cytometry analysis to gate on antibody-secreting cells (CD138+IRF4+). **(D)** Absolute number of antibody-secreting cells (CD138+IRF4+), (statistical significant differences: Meto vs PBS  $p < 0.05$ , Meto vs 15 weeks  $p < 0.01$ , Meto vs 8 weeks  $p < 0.001$ ). **(E)** Correlation between PRL concentrations and the absolute numbers of B-GCs. **(F)** Correlation between PRL concentrations and the absolute numbers of ASCs. Eight mice were used per condition. Pooled data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  using one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test. Correlations were obtained using Pearson's correlation coefficient.

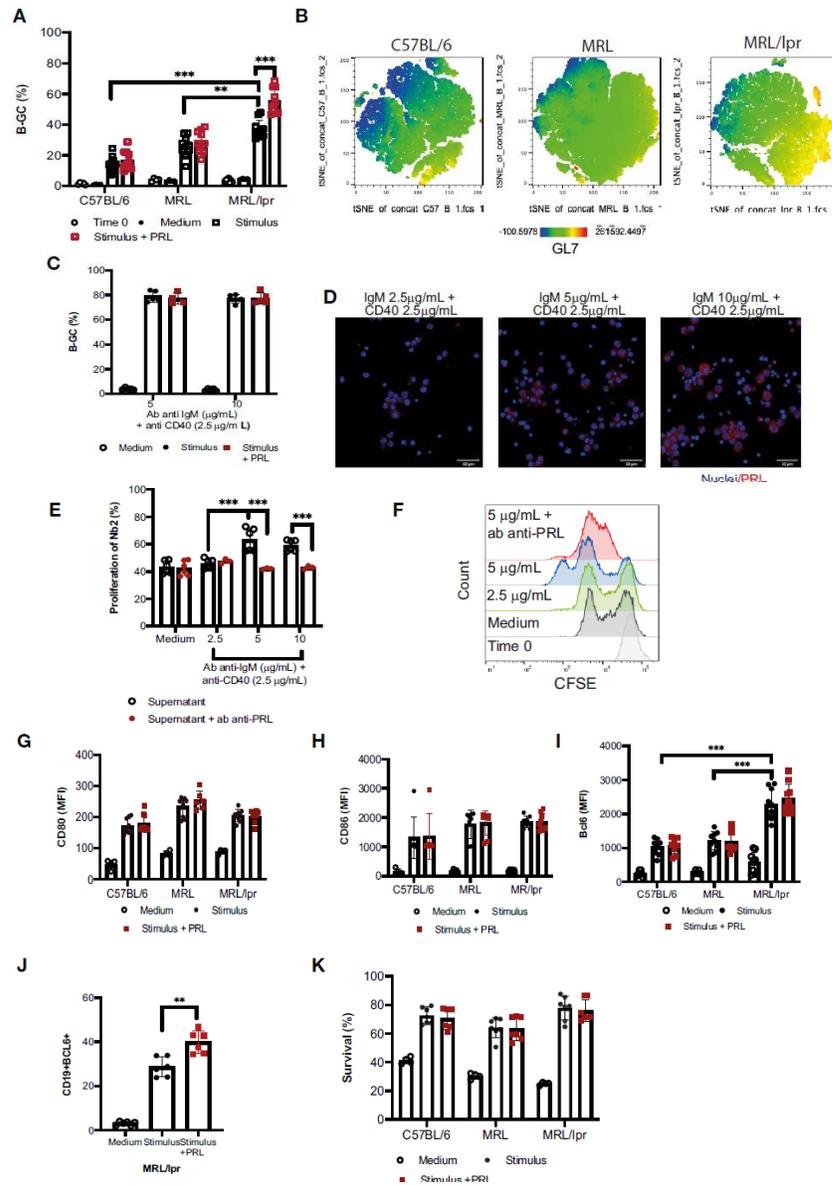


FIGURE 3

Prolactin increases the percentage of B-GCs in vitro. B-cell splenocytes from female 8-week-old C57BL/6, MRL, and MRL/lpr mice were purified by MACS cell separation (Time zero). The cells were differentiated into B-GCs with anti-CD40 (2.5 µg/mL) and anti-IgM (2.5 µg/mL) antibodies with or without PRL (50 ng/mL) for 48 h. B cells were stained with a viability marker (Ghost Red-APC-Cy7) and antibodies against CD19-PerCP-Cy5.5, GL7-Pacific-Blue and BCL6-PE. (A) Percentage of differentiation of B-GCs. (B) t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plots for each mouse strain showing an enriched GL7-expressing population in the MRL/lpr mice. Eight independent experiments were performed. (C) Purified B cells from MRL/lpr mice were differentiated with anti-CD40 antibody (2.5 µg/mL) and with different concentrations of anti-IgM antibody (5 µg/mL and 10 µg/mL) with or without PRL (50 ng/mL) for 48 h. Five independent experiments were carried out, and each experiment was done in duplicate. (D) Immunofluorescence staining of PRL produced by B-GC cells. (E) The presence of PRL in the supernatants of B-GC cells was determined by measuring the proliferation of Nb2 cells. CFSE-labeled Nb2 cells were incubated with supernatants of B-GCs that were differentiated with anti-CD40 (2.5 µg/mL) and different concentrations of anti-IgM (2.5, 5, and 10 µg/mL), six independent experiments were carried out. The controls were medium alone or medium plus anti-PRL antibody. In the latter, supernatants were pre-incubated with anti-PRL antibody to block PRL activity, three independent experiments were carried out, and each experiment was done in duplicate. (F) Representative histograms of Nb2 cell proliferation. Purified B cells were incubated with anti-CD40 (2.5 µg/mL) and anti-IgM (2.5 µg/mL) antibodies with or without PRL (50 ng/mL) for 24 h, and the cells were stained with Ghost Red and antibodies against CD19-PerCP-Cy5, CD80-PE, and CD86-PE. Mean fluorescence intensity (MFI) of (G) CD80 and (H) CD86. Purified B cells were stimulated as in (A) and then stained with Ghost Red and antibodies against CD19, GL7, and BCL6. (I) MFI of BCL6 in B-GCs, (J) percentage of CD19+ BCL6+ cells (B-GCs) and (K) percentage of surviving B-GCs differentiated for 48 h in the presence and absence of PRL. Six to eight independent experiments were carried out. Pooled data are shown as the means  $\pm$  standard deviations (SD). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  using one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test.

number of differentiating B-GCs. PRL can increase the survival of immature B cells in MRL/lpr mice (20). However, we did not observe an increased survival of PRL-treated B-GCs in the culture conditions (Figure 3K). Therefore, the PRL-mediated enhanced survival of differentiating B-GCs does not explain their increased frequency.

The t-SNE visualization of B-GCs from the MRL/lpr strain shows that the cells were clustered into two distinct populations in the presence of PRL (Figure 4A). Since PRL favors an increase in the percentage of B-GCs without affecting their activation or differentiation into BCL6+ B-GCs, we determined whether PRL could affect their proliferation. We observed an increase in the percentage of Ki67+ B-GCs when the *in vitro* differentiation was carried out in the presence of PRL (without PRL,  $11.70 \pm 4.76\%$ ; with PRL,  $18.68 \pm 5.13\%$ ;  $p=0.0135$ ) (Figure 4B). This was verified by carrying out proliferation assays with CFSE, the proliferation index increased when the B cells were differentiated with PRL (Figure 4C). The effect of PRL on proliferation was confirmed using purified FO B cells (instead of total B cell splenocytes) sorted from 8-week-old MRL/lpr mice (Figure 4D). We observed that PRL also favors the proliferation and formation of B-GCs when FO B cells are used (Figures 4E-G).

## Prolactin increases the concentration of IL-6 in B-GCs supernatants

Although the GC is maintained by the expression of multiple cytokines, most of them are secreted by reticular or dendritic follicular cells. Of particular interest is IL-6, since it is also secreted by B-GCs (25). We assessed whether hyperprolactinemic MRL/lpr mice increased the secretion of IL-6 and found enhanced levels of IL-6 in metoclopramide-treated mice ( $p<0.05$ ), and a positive correlation between the levels in serum of PRL and IL-6 (Figures 5A, B). Since these systemic IL-6 levels may be explained by multiple factors affecting the MRL/lpr mice, we also measured the concentration of IL-6 in the supernatants of the *in vitro* differentiated B-GCs in the presence and absence of PRL. We found that the IL-6 concentration and the percentage of IL-6+ cells increased when the cells were differentiated in the presence of PRL (Figures 5C-E), further supporting that PRL promotes IL-6 secretion in B-GCs in lupus-prone mice.

## Prolactin favors the differentiation of antibody-secreting cells and increases the concentration of the IgG3 isotype

IRF4 is a critical transcription factor for initiating the differentiation of ASCs (26, 27). Our results showed that PRL increased IRF4 expression in B-GCs only in MRL/lpr mice

(without PRL,  $3560 \pm 114.98$  MFI; with PRL,  $3798 \pm 160.17$  MFI,  $p<0.05$ ), probably favoring differentiation to ASCs (Figures 6A, B). We determined the percentage of ASCs (CD138+IRF4+) after differentiating B cells for 5 days with or without PRL (50 ng/mL). The results showed that the B cells from the MRL/lpr strain had a higher potential for ASC differentiation ( $11.81 \pm 1.77\%$ ) than the B cells from the MRL ( $8.19 \pm 1.70\%$ ;  $p<0.05$ ) and C57BL/6 strain ( $4.75 \pm 0.98\%$ ;  $p=0.001$ ). PRL further increased this potential to form ASCs in the MRL/lpr strain ( $15.10 \pm 1.60\%$ ;  $p<0.01$ ) (Figure 6C). The concentration of the different isotypes of antibody present in the supernatants was also determined, which confirmed that the IgG3 isotype concentrations increased in the supernatants of the MRL/lpr strain B cells that were differentiated with PRL ( $p<0.05$ ) (Figures 6D-G). This was not observed in the other two strains (Supplementary Figures 3, 4).

## Prolactin signals through STAT1 on B-CG cells

Finally, the pathway by which PRL signals in B-GCs was determined. There are different isoforms of the PRL receptor in mice (short and long isoforms), and the different isoforms signal through different pathways. We first determined the isoform of the PRL receptor expressed in B-GC cells from 15 weeks MRL/lpr mice (*in vivo*) and in *in vitro* differentiated B-GCs by real-time PCR. We used the breast cancer cell line 4T1 as a control for expression of both isoforms (Supplementary Figure 5A). We observed that mainly the long isoform was expressed in B-GC cells (Figure 7A). However, both isoforms were expressed in B-GC cells from C57BL/6 and MRL mice (Supplementary Figure 5B). Since STAT1, STAT3, STAT5, AKT, and ERK can be activated by the long isoform of the PRL receptor, the phosphorylation (p) of each of these proteins in B-GCs was determined by phospho flow cytometry. Our results demonstrated that PRL increased the percentage of pSTAT1+ B-GCs and the MFI of pSTAT1 in both the MRL/lpr (Figures 7B-D) and MRL mice (Supplementary Figures 5C, D). PRL also slightly increased the percentage of pAKT only in the MRL/lpr mice but without an increase in the MFI (Figures 7E, F, Supplementary Figure 5). PRL did not influence the percentage of positive cells (Figures 7G-I, Supplementary Figure 5) or the MFIs (not shown) of pSTAT3, pSTAT5, and pERK in B-GCs. Taken together, these data support that B-GCs from the SLE-prone MRL/lpr mouse strain express the long PRL receptor and that PRL signals through this receptor are mediated by pSTAT1 and perhaps pAKT. PRL signaling favors the expansion of these cells and the differentiation of significantly more autoreactive ASCs with the capacity to secrete larger numbers of IgG3 antibodies, some directed against autoantigens, such as DNA and histones, and with the potential to lead to tissue damage (see Figure 8 for our current working model).

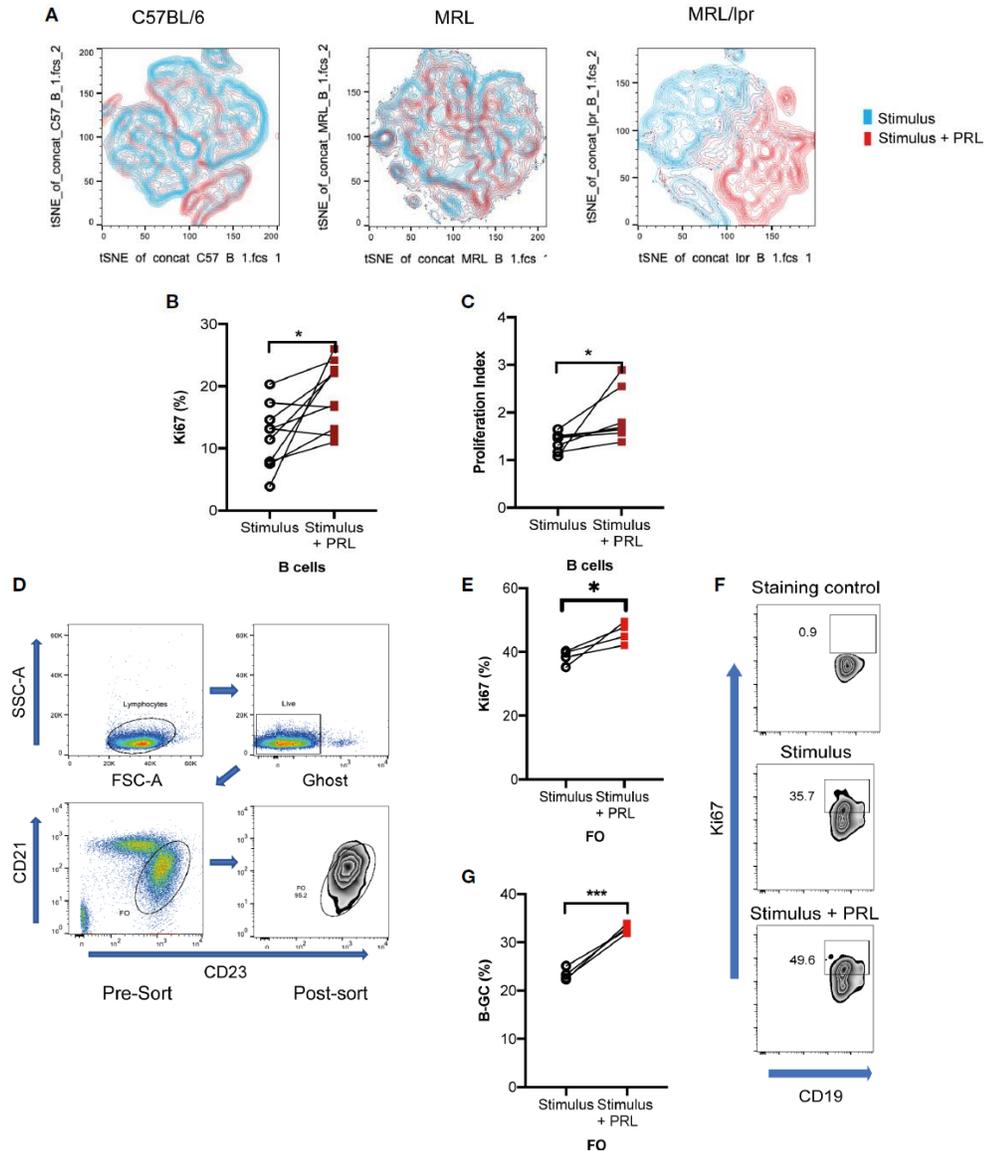


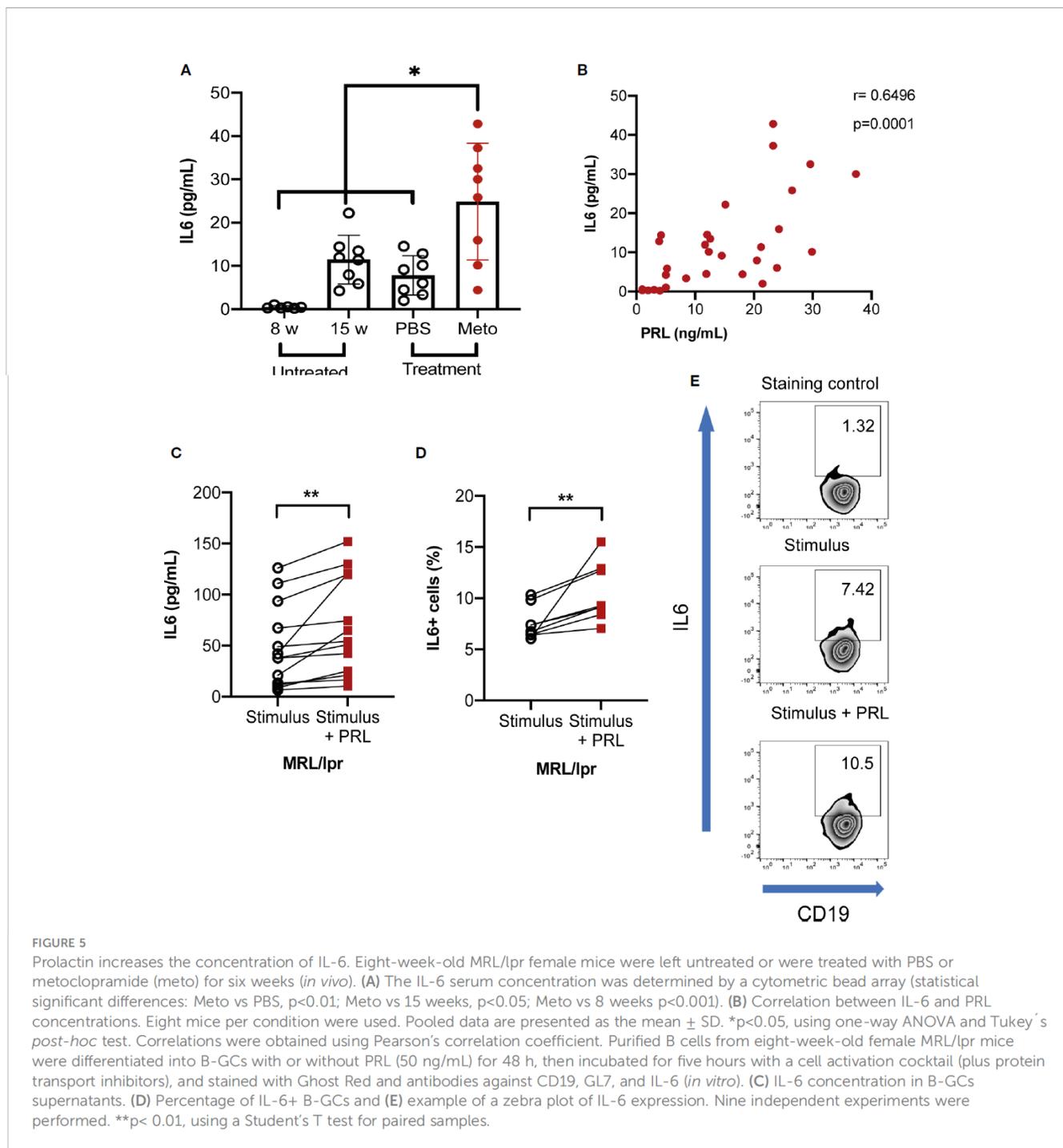
FIGURE 4

Prolactin increases B-GC cell proliferation. Purified B cells from 8-week-old female C57BL/6, MRL, and MRL/lpr mice were differentiated into B-GCs with or without PRL (50 ng/mL) for 48 h, and then stained with Ghost Red-APC-Cy7- and antibodies against CD19-PerCP-Cy5.5, GL7-Pacific Blue, BCL6-PE, Ki67-Alexa488, and IRF4-PE-Cy7. (A) t-SNE plots for each mouse strain. (B) Percentage of Ki67-expressing B-GCs in MRL/lpr mice. (C) B-GCs proliferation index. Eight independent experiments were performed, \*  $p < 0.05$ . Follicular B cells (FO) from 8-week-old female MRL/lpr mice were sort-purified and differentiated to B-GCs with or without PRL (50 ng/mL). (D) Demonstration of the gating strategy to sort FO-B cells. (E) Percentage of Ki67 expression in B-GCs (from FO cells), (F) examples of zebra plots of Ki67+ cells, and (G) percentage of differentiated B-GCs (from FO cells). Three independent experiments were carried out, and each experiment was conducted in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  using a Student's T test for paired samples.

## Discussion

A positive correlation between PRL and anti-dsDNA antibody concentrations has been demonstrated in SLE patients (13), and women with hyperprolactinemia have a higher prevalence of autoantibodies (14). However, the molecular mechanism through which PRL increases autoantibody levels is unclear.

Here, we observed a positive correlation between serum concentrations of PRL and anti-dsDNA autoantibodies of the IgG3 isotype ( $r=0.7369$ ;  $p=0.0001$ ), while IgM was negatively correlated ( $r=-0.3449$ ;  $p=0.7808$ ), suggesting a potential influence of PRL in class-switch recombination, a central process of the GC reaction (28). In the MRL/lpr and other murine models of autoimmunity, the presence of spontaneous GC has been



demonstrated in the absence of detectable infection or immunization (2, 29). Different factors contribute to the development of spontaneous GC and enhanced risk of developing autoimmunity in humans and mice, such as BAFF (30, 31) and IFN $\gamma$ -receptor (32, 33) overexpression, inflammatory cytokines, constitutive CD40 signaling (34), and human endogenous retrovirus (HERV) expression (35), etc. PRL could act as one of these factors, since our results also showed a positive correlation between PRL levels and absolute numbers of B-GCs in

the spleen, and *in vitro* differentiation of FO B cells showed preferential formation of B-GCs.

It will be interesting to study whether other hormones that have been associated with SLE activity and whose secretion is also induced by metoclopramide, such as growth hormone (36, 37), and estrogens (38, 39) could also influence the formation of GC.

PRL does not seem to affect the formation of mature FO and MZ B cells, since we did not find differences in the absolute numbers of these populations (16). However, in T cells PRL

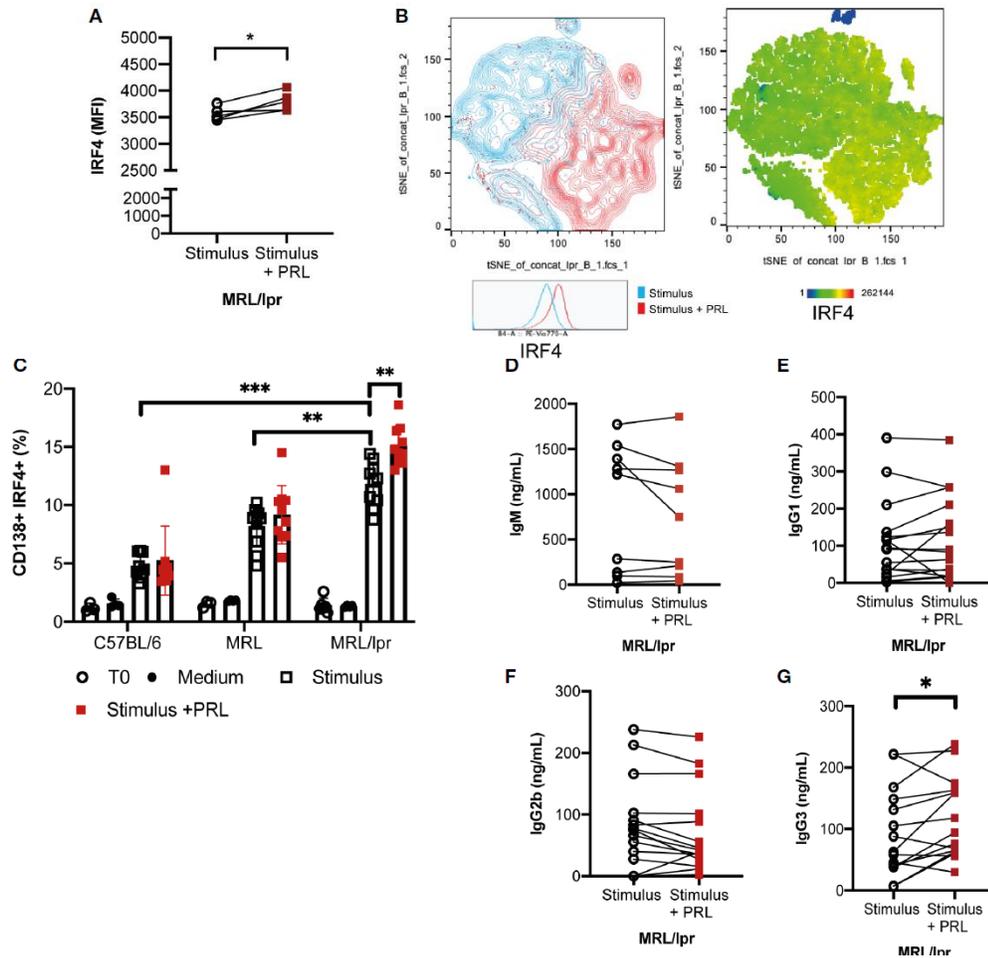


FIGURE 6

Prolactin promotes the development of IRF4+ antibody-secreting cells, and an enhanced concentration of IgG3 antibodies. Purified B cells from 8-week-old female MRL/lpr mice (Time zero) were differentiated into B-GCs with or without PRL (50 ng/mL) for 48 h and stained with Ghost Red and antibodies against CD19, GL7, BCL6, and IRF4. (A) MFI of IRF4. (B) t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plots showing the population with enhanced expression of IRF4. Pooled data are presented as the mean  $\pm$  SD \* $p$  < 0.05 using a Student's T test for paired samples. B cells purified from 8-week-old female C57BL/6, MRL/lpr, and MRL mice were differentiated into ASCs with or without PRL (50 ng/mL) for five days, and cells were stained with Ghost Red and antibodies against CD19, GL7, CD138, and IRF4. (C) Percentage of differentiation to ASCs (CD138+, IRF4+). Eight to nine independent experiments were performed. Pooled data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 using one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test. In the supernatants of these cells, the concentrations of the isotypes (D) IgM, (E) IgG1, (F) IgG2b, and (G) IgG3 were determined by ELISA. \* $p$  < 0.05 using a Student's T test for paired samples.

increases the expression of CD25 and CD69 (activation molecules) on T cells (40, 41), and of OX40 on follicular T cells (42). We did not observe an effect of PRL on the expression of the B-cell activation markers CD80 and CD86. This is consistent with other studies in healthy subjects where B cells were incubated with PRL, and no effect on the expression of CD40 and CD86 was observed. Nevertheless, an increase in antibody production was reported (43). Therefore, PRL seems to differentially affect B cells and T cells.

- PRL is a multifunctional hormone that is essential for the survival and proliferation of different cell types, both immune and nonimmune (44, 45). PRL regulates apoptosis by increasing

the expression of antiapoptotic genes in both T cells (46), and immature B cells (20). Although in immature B cells from MRL/lpr mice, PRL can increase the survival and protect against apoptosis, it did not have this effect on already differentiated mature B cells (B-GCs), even though both cells express the long isoform of the receptor. This difference may be due to differential signaling pathway activation mediated by PRL at each stage of B-cell maturation, while in immature B cells, it seems to preferentially activate STAT3 (20). We observed here that it preferentially activates STAT1 in B-GC cells.

Interestingly, activation of STAT1 in B-GCs by PRL correlates with an increase in their proliferation, as measured

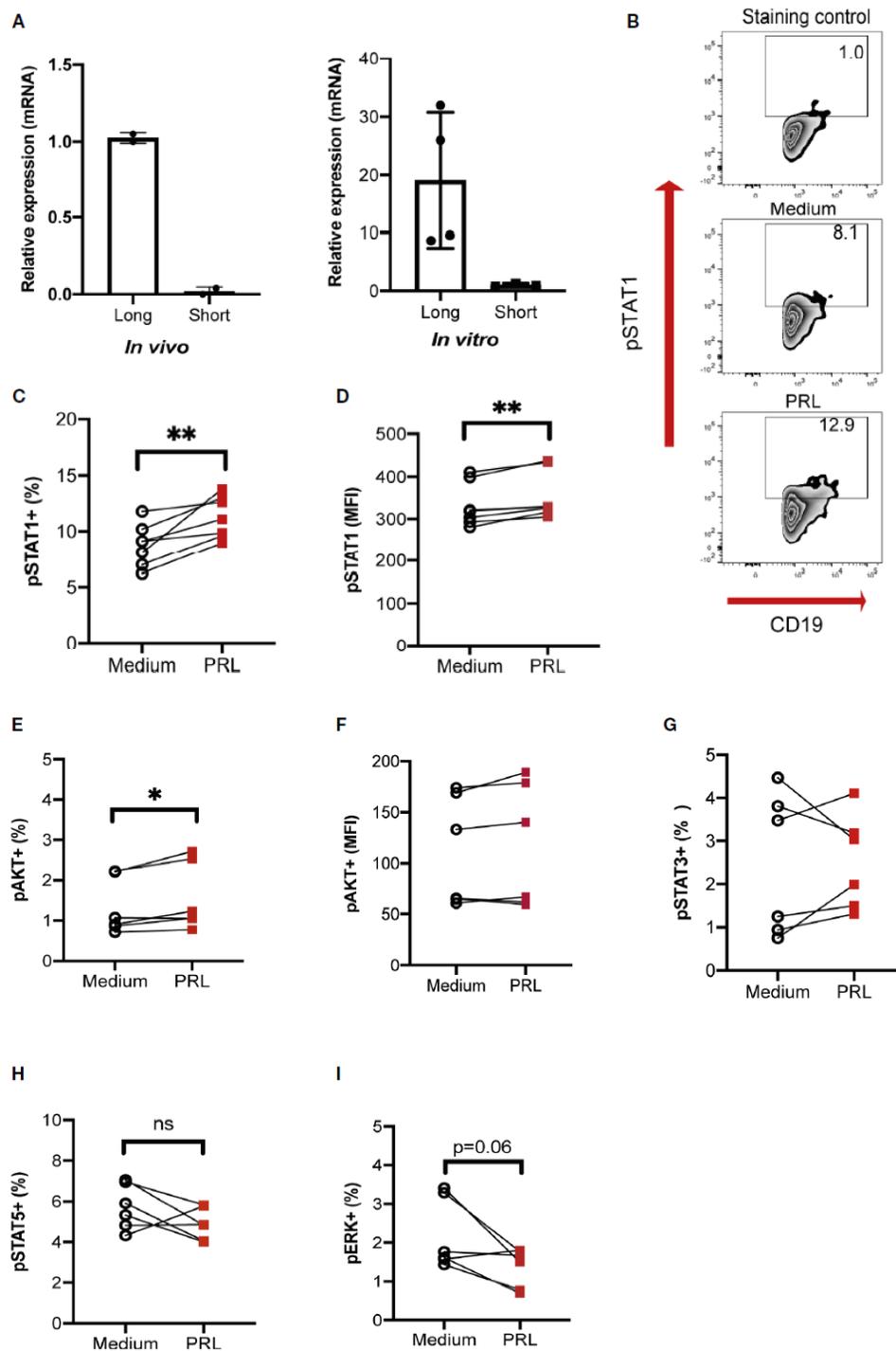


FIGURE 7

PRL signals through the long receptor isoform and STAT1 in B-GCs. B cells purified from female MRL/lpr mice were differentiated into B-GCs for 48 h (*in vitro*), and B-GC cells were obtained directly from 15-weeks-old female MRL/lpr mice (*in vivo*). (A) The relative expression and identity of the PRL receptor isoforms were determined by real-time (RT)-PCR (normalized to the endogenous gene  $\beta$ -actin and using the breast cancer cell line 4T1 as a control for the expression of both isoforms). To determine the percentage of phosphorylated cells, B-GCs were differentiated for 48 h, left in medium for 8 h and then stimulated for 30 min with PRL to determine (B) zebra plots of pSTAT1, (C) the percentage of pSTAT1, (D) MFI of pSTAT1 (E) the percentage of pAKT, (F) MFI of pAKT, and the percentages of (G) pSTAT3, (H) pSTAT5, and (I) pERK. Six independent experiments were performed. Pooled data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns, no statistical differences using a Student's T test for paired samples.

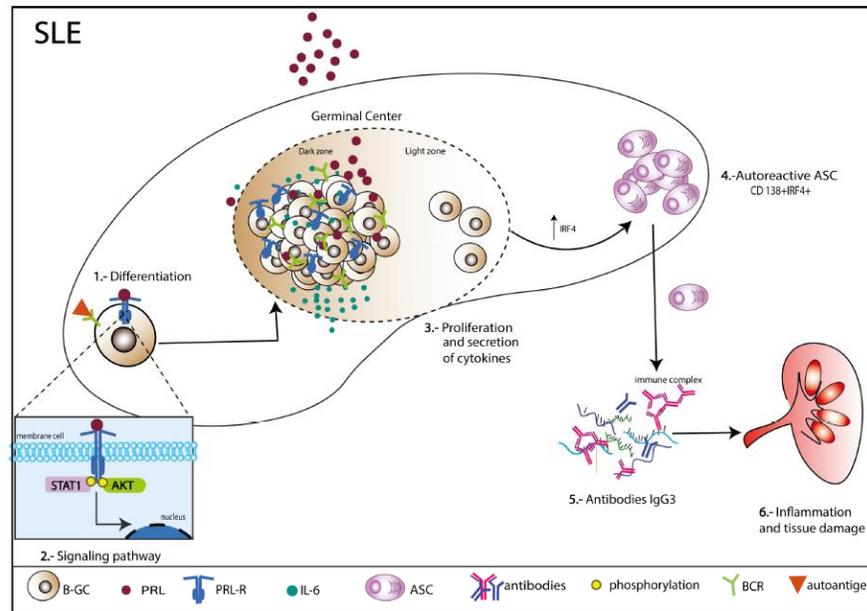


FIGURE 8

Mechanism of action of PRL in germinal center B cells (B-GCs) in SLE-susceptible mice. B-GCs from MRL/lpr mice that develop SLE express the long isoform of the PRL receptor. PRL can signal to a greater extent through STAT1 and increase the proliferation of B-GCs. Additionally, PRL can induce an increase in IRF4, which would favor ASC differentiation (CD138+IRF4+) and an increase in autoantibodies, especially of the IgG3 isotype, which could lead to the formation of immune complexes capable of depositing in multiple organs and causing tissue damage.

by the number of Ki67+ B-GCs and an enhanced proliferation index (CFSE assay), suggesting that signaling through STAT3 favors survival of immature cells, while signaling through STAT1 favors proliferation of B-GCs. In agreement with these results, STAT3 is central to the transcriptional activation of the pro-survival genes *Bcl2a1a*, *Bcl2l2*, and *Birc5* (20). This is also supported by the report that IFN $\gamma$  receptor (IFN $\gamma$ -R) signaling controls spontaneous GC formation through phosphorylation of STAT1 and that proliferation and the percentage of B-GCs are affected in IFN $\gamma$ -R<sup>-/-</sup> mice (47). Furthermore, in MRL/lpr mice, the expression of STAT1 has been associated with increased kidney nephritis in MRL/lpr mice (48). Therefore, PRL could have a synergistic effect with the cytokines that phosphorylate STAT1, such as IFN $\gamma$ , and that is important for GC formation (47). In future research, it will be important to determine the genes regulated by PRL and STAT1 signaling in B-GCs.

The increase in the proliferation of B-GCs by PRL also resulted in an increase in the percentage of IL6+ cells, and elevated concentrations of IL-6 in the serum of mice and supernatants of differentiated B-GCs correlated with high PRL concentrations. IL-6 serum levels are markedly increased in mice with autoimmunity (25, 49), and human patients with SLE (50, 51). IL-6 is required for the GC formation because it facilitates the expression of master regulator BCL6 in helper follicular T-

cell differentiation. In B cells, the activation of STAT3 by IL6 is critical for initiating ASC differentiation programs (52, 53).

The generation of ASCs requires silencing of B-cell transcriptional programs and activation of a unique ASC transcriptome geared toward the production of large amounts of antibodies. This transition is achieved through the concerted function of the transcription factors XBP1, IRF4 and BLIMP1. We observed that PRL increased the levels of IRF4 in B-GCs. This increase, together with the increase in the concentration of IL-6 that activates the STAT3 pathway (27, 52, 54, 55), probably triggers ASC differentiation, leading to both an expansion in the absolute number of ASCs and an increase in the levels of autoantibodies.

The presence of autoantibodies against nuclear antigens, mainly against dsDNA, in the MRL/lpr strain has been extensively reported (56, 57). However, those studies only report the isotype (IgG). In the few studies in which IgG subclasses were determined, the main subclasses reported were IgG2a and IgG3 (58–62). We observed a remarkable specific correlation between PRL and anti-dsDNA and anti-histone antibodies of the IgG3 isotype. IgG3 protects mice against different bacterial infections (63). IgG3 is also the principal IgG isotype associated with kidney damage in mice. IgG3 causes glomerular injury independent of activation of

complement. This capacity to induce damage may be due to other properties of IgG3. For instance, it has been shown that IgG3 has an ability to form non-covalent oligomers (64, 65), and this capacity of self-association seems to provide multivalent properties to IgG3 (66). For example, IgG3 induces hemagglutination with similar efficacy as IgM (67). In 2021 Alicja Karabasz et al, reported that an unknown IgG3-specific receptor is expressed on the surface of J774A.1 and P388D1 monocyte/macrophage-like cells (39). Activation of monocytes/macrophages through this receptor may contribute to Kidney damage. Furthermore, monoclonal antibodies of the IgG3 isotype directed against dsDNA were found to cause lesions similar to those described in human lupus nephritis in MRL/lpr (68) and (NZB×NZW)F1 (69). Hence, the IgG3 anti-dsDNA antibodies are an important factor in the development of glomerular lesions in the strains of mice that develop SLE (58, 70, 71). Thus, the kidney damage (proteinuria) repeatedly seen in mice with elevated PRL levels may be due to the increase in the pathogenic anti-DNA IgG3 autoantibodies. It is necessary to thoroughly dissect the specific mechanisms by which PRL facilitates the formation of IgG3-producing self-reactive ASCs to devise precision therapies.

## Limitations of the study

Among the weaknesses of the study is the lack of a more detailed B-GC analysis of the genes regulated by the PRL-activated pSTAT1 pathway that led to the preferential formation of IgG3-secreting autoreactive ASCs. We were also unable to block PRL receptor signaling *in vivo* to assess whether the lupus symptoms in the MRL/lpr mice would ameliorated.

## Data availability statement

The original data presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” and by the Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (protocol numbers R-2016-785-050 and R-2021-3603-029).

## Author contributions

RC-T and PS-S worked to the design and performance of the experiments, analysis, and interpretation of the data. ML-H performed the experiments and analyzed the data. LC-S and PG-R contributed to the interpretation of data and statistical analyses. EF-P contributed to the design of experiments and supervised the editing and writing of the work. AC-R designed the experiments, supervised the experimental work, and wrote and edited the manuscript. All authors contributed to the article and read and approved the submitted version of the manuscript.

## Funding

This work was supported by CONACYT (grant number A1-S-9789).

## Acknowledgments

We want to express our appreciation the Flow Cytometry and Confocal microscopy core facility, the Coordinación de Investigación en Salud, CMN SXXI, IMSS, for the instrumental and technical support.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1017115/full#supplementary-material>

## References

- Young C, Brink R. The unique biology of germinal center b cells. *Immunity* (2021) 54(8):1652–64. doi: 10.1016/j.immuni.2021.07.015
- Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, daSilva LC, Kelsoe G, Papadimitriou JC, et al. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *J Leukoc Biol* (2001) 70(4):578–84. doi: 10.1189/jlb.70.4.578
- Diamond B, Katz JB, Paul E, Aranow C, Lustgarten D, Scharff MD. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol* (1992) 10:731–57. doi: 10.1146/annurev.iy.10.040192.003503
- Cappione A3rd, Anolik JH, Pugh-Bernard A, Barnard J, Dutcher P, Silverman G, et al. Germinal center exclusion of autoreactive b cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* (2005) 115(11):3205–16. doi: 10.1172/JCI24179
- Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* (2014) 384(9957):1878–88. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60128-8
- Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J Autoimmun* (2019) 96:1–13. doi: 10.1016/j.jaut.2018.11.001
- Nusbaum JS, Mirza I, Shum J, Freilich RW, Cohen RE, Pillinger MH, et al. Sex differences in systemic lupus erythematosus: Epidemiology, clinical considerations, and disease pathogenesis. *Mayo Clin Proc* (2020) 95(2):384–94. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.09.012
- Barber MRW, Drenkard C, Falasinnu T, Hoi A, Mak A, Kow NY, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* (2021) 17(9):515–32. doi: 10.1038/s41584-021-00668-1
- Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and autoimmunity. *Front Immunol* (2018) 9:73. doi: 10.3389/fimmu.2018.00073
- Quatrini L, Ricci B, Ciancaglini C, Tumino N, Moretta L. Regulation of the immune system development by glucocorticoids and sex hormones. *Front Immunol* (2021) 12:672853. doi: 10.3389/fimmu.2021.672853
- Rezaeiyazdi Z, Hesamifard A. Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatol Int* (2006) 26(11):1036–9. doi: 10.1007/s00296-006-0129-0
- Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leñón-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Influence Stat power J Rheumatol* (1999) 26(1):55–9.
- Yang J, Li Q, Yang X, Li M. Increased serum level of prolactin is related to autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2016) 25(5):513–9. doi: 10.1177/0961203315622276
- Liu Y, Zhang Z, Jin Q, Liu Y, Kang Z, Huo Y, et al. Hyperprolactinemia is associated with a high prevalence of serum autoantibodies, high levels of inflammatory cytokines and an abnormal distribution of peripheral b-cell subsets. *Endocrine* (2019) 64(3):648–56. doi: 10.1007/s12020-019-01896-y
- Legorreta-Haquet MV, Flores-Fernández R, Blanco-Favela F, Fuentes-Panana EM, Chávez-Sánchez L, Hernández-González R, et al. 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) 2013:287469. doi: 10.1155/2013/287469
- Ledesma-Soto Y, Blanco-Favela F, Fuentes-Panana EM, Tesoro-Cruz E, Hernández-González R, Arriaga-Pizano L, et al. 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* (2012) 13:11. doi: 10.1186/1471-2172-13-11
- Elbourne KB, Keisler D, McMurray RW. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *Lupus* (1998) 7(6):420–7. doi: 10.1191/096120398678920352
- Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab* (2010) 21(6):362–8. doi: 10.1016/j.tem.2010.01.008
- Mangoura D, Pelletiere C, Leung S, Sakellariadis N, Wang DX. Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci* (2000) 18(7):693–704. doi: 10.1016/S0736-5748(00)00031-9
- Flores-Fernández R, Aponte-López A, Suárez-Arriaga MC, Gorocica-Rosete P, Pizaña-Venegas A, Chávez-Sánchez L, et al. Prolactin rescues immature b cells from apoptosis-induced BCR-aggregation through STAT3, Bcl2a1a, Bcl2l2, and Birc5 in lupus-prone MRL/lpr mice. *Cells* (2021) 10(2):1–19. doi: 10.3390/cells10020316
- Flores-Fernández R, Blanco-Favela F, Fuentes-Panana EM, Chávez-Sánchez L, Gorocica-Rosete P, Pizaña-Venegas A, et al. Prolactin rescues immature b-cells from apoptosis induced by b-cell receptor cross-linking. *J Immunol Res* (2016) 2016:3219017. doi: 10.1155/2016/3219017
- Mergaert AM, Bawadekar M, Nguyen TQ, Massarenti L, Holmes CL, Rebernick R, et al. Reduced anti-histone antibodies and increased risk of rheumatoid arthritis associated with a single nucleotide polymorphism in PAD14 in north americans. *Int J Mol Sci* (2019) 20(12):1–14. doi: 10.3390/ijms20123093
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* (1980) 51(5):1058–63. doi: 10.1210/jcem-51-5-1058
- Belkina AC, Ciccolella CO, Anno R, Halpert R, Spidlen J, Snyder-Cappione JE. Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nat Commun* (2019) 10(1):5415. doi: 10.1038/s41467-019-13055-y
- Arkatkar T, Du SW, Jacobs HM, Dam EM, Hou B, Buckner JH, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J Exp Med* (2017) 214(11):3207–17. doi: 10.1084/jem.20170580
- Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* (2006) 25(2):225–36. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.009
- Low MSY, Brodie EJ, Fedele PL, Liao Y, Grigoriadis G, Strasser A, et al. IRF4 activity is required in established plasma cells to regulate gene transcription and mitochondrial homeostasis. *Cell Rep* (2019) 29(9):2634–45.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.097
- Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, et al. Class-switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity* (2019) 51(2):337–50.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.001
- Domeier PP, Schell SL, Rahman ZS. Spontaneous germinal centers and autoimmunity. *Autoimmunity* (2017) 50(1):4–18. doi: 10.1080/08916934.2017.1280671
- Wensveen FM, Slinger E, van Attekum MH, Brink R, Eldering E. Antigen-affinity controls pre-germinal center b cell selection by promoting mcl-1 induction through BAFF receptor signaling. *Sci Rep* (2016) 6:35673. doi: 10.1038/srep35673
- Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* (1999) 190(11):1697–710. doi: 10.1084/jem.190.11.1697
- Lee SK, Silva DG, Martin JL, Pratama A, Hu X, Chang PP, et al. Interferon- $\gamma$  excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. *Immunity* (2012) 37(5):880–92. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.010
- Jackson SW, Jacobs HM, Arkatkar T, Dam EM, Scharping NE, Kolhatkar NS, et al. B cell IFN- $\gamma$  receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *J Exp Med* (2016) 213(5):733–50. doi: 10.1084/jem.20151724
- Luo W, Weisel F, Shlomchik MJ. B cell receptor and CD40 signaling are rewired for synergistic induction of the c-myc transcription factor in germinal center b cells. *Immunity* (2018) 48(2):313–26.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.008
- Trovato M, Ibrahim HM, Isnard S, Le Grand R, Bosquet N, Borhis G, et al. Distinct features of germinal center reactions in macaques infected by SIV or vaccinated with a T-dependent model antigen. *Viruses* (2021) 13(2):1–35. doi: 10.3390/v13020263
- Zhu X, Xu J, Li S, Huang W, Li F. Role of abnormal anterior pituitary hormones-growth hormone and prolactin in active systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8(10):19223–31.
- Cunha-Filho JS, Gross JL, Vettori D, Dias EC, Passos EP. Growth hormone and prolactin secretion after metoclopramide administration (DA2 receptor blockade) in fertile women. *Horm Metab Res* (2001) 33(9):536–9. doi: 10.1055/s-2001-17214
- Moulton VR. Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease. *Front Immunol* (2018) 9:2279. doi: 10.3389/fimmu.2018.02279
- Karabas A, Bzowska M, Bereta J, Czarnek M, Sochalska M, Klaus T. Mouse IgG3 binding to macrophage-like cells is prevented by deglycosylation of the antibody or by acetate treatment of the cells. *Sci Rep* (2021) 11(1):10295. doi: 10.1038/s41598-021-89705-3
- Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Cervera-Castillo H, Sánchez L, Jara LJ, Zenteno E, et al. Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Rheumatol* (2005) 23(6):769–77.
- Takizawa K, Kitani S, Takeuchi F, Yamamoto K. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J* (2005) 52(5):635–41. doi: 10.1507/endocrj.52.635

42. Alemán-García YP, Vaquero-García RM, Flores-Fernández R, Fuentes-Pananá EM, Gorocica-Rosete P, Pizaña-Venegas A, et al. Prolactin increases the frequency of follicular T helper cells with enhanced IL21 secretion and OX40 expression in lupus-prone MRL/lpr mice. *J Immunol Res* (2021) 2021:6630715. doi: 10.1155/2021/6630715
43. Chavez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leaña-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. 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* (2005) 116(2):182–91. doi: 10.1016/j.clim.2005.03.013
44. Hyslop CM, Tsai S, Shrivastava V, Santamaria P, Huang C. Prolactin as an adjunct for type 1 diabetes immunotherapy. *Endocrinology* (2016) 157(1):150–65. doi: 10.1210/en.2015-1549
45. Lee HY, Heo YT, Lee SE, Hwang KC, Lee HG, Choi SH, et al. Short communication: retinoic acid plus prolactin to synergistically increase specific casein gene expression in MAC-T cells. *J Dairy Sci* (2013) 96(6):3835–9. doi: 10.3168/jds.2012-5945
46. Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ, Buckley AR. Prolactin regulation of bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol* (2003) 178(2):265–73. doi: 10.1677/joe.0.1780265
47. Domeier PP, Chodiseti SB, Soni C, Schell SL, Elias MJ, Wong EB, et al. IFN- $\gamma$  receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J Exp Med* (2016) 213(5):715–32. doi: 10.1084/jem.20151722
48. Dong J, Wang QX, Zhou CY, Ma XF, Zhang YC. Activation of the STAT1 signalling pathway in lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus* (2007) 16(2):101–9. doi: 10.1177/0961203306075383
49. Marczyński P, Meineck M, Xia N, Li H, Kraus D, Roth W, et al. Vascular inflammation and dysfunction in lupus-prone mice—IL-6 as mediator of disease initiation. *Int J Mol Sci* (2021) 22(5):1–14. doi: 10.3390/ijms22052291
50. Gröndal G, Gunnarsson I, Rönnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* (2000) 18(5):565–70.
51. Lu R, Munroe ME, Guthridge JM, Bean KM, Fife DA, Chen H, et al. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *J Autoimmun* (2016) 74:182–93. doi: 10.1016/j.jaut.2016.06.001
52. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, López-Blanco R, Campos-Caro A, Brieva JA. STAT-3 activation by differential cytokines is critical for human *in vivo*-generated plasma cell survival and Ig secretion. *J Immunol* (2013) 191(10):4996–5004. doi: 10.4049/jimmunol.1301559
53. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* (2000) 19(21):2548–56. doi: 10.1038/sj.onc.1203551
54. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* (2013) 38(5):918–29. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.009
55. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med* (2013) 210(12):2739–53. doi: 10.1084/jem.20130323
56. Shen C, Xue X, Zhang X, Wu L, Duan X, Su C. Dexamethasone reduces autoantibody levels in MRL/lpr mice by inhibiting Th1 cell responses. *J Cell Mol Med* (2021) 25(17):8329–37. doi: 10.1111/jcmm.16785
57. Chen C, Li H, Tian Q, Beardall M, Xu Y, Casanova N, et al. Selection of anti-double-stranded DNA B cells in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* (2006) 176(9):5183–90. doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5183
58. Greenspan NS, Lu MA, Shipley JW, Ding X, Li Q, Sultana D, et al. IgG3 deficiency extends lifespan and attenuates progression of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Biol Direct* (2012) 7:3. doi: 10.1186/1745-6150-7-3
59. Izui S, Berney T, Shibata T, Fulpius T. IgG3 cryoglobulins in autoimmune MRL-lpr/lpr mice: immunopathogenesis, therapeutic approaches and relevance to similar human diseases. *Ann Rheum Dis* (1993) 52 Suppl 1(Suppl 1):S48–54. doi: 10.1136/ard.52.Suppl\_1.S48
60. Boackle SA, Culhane KK, Brown JM, Haas M, Bao L, Quigg RJ, et al. CR1/CR2 deficiency alters IgG3 autoantibody production and IgA glomerular deposition in the MRL/lpr model of SLE. *Autoimmunity* (2004) 37(2):111–23. doi: 10.1080/08916930410001685063
61. Jacobson BA, Rothstein TL, Marshak-Rothstein A. Unique site of IgG2a and rheumatoid factor production in MRL/lpr mice. *Immunol Rev* (1997) 156:103–10. doi: 10.1111/j.1600-065X.1997.tb00962.x
62. Mu Q, Zhang H, Liao X, Lin K, Liu H, Edwards MR, et al. Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota. *Microbiome* (2017) 5(1):73. doi: 10.1186/s40168-017-0300-8
63. Klaus T, Bereta J. CH2 domain of mouse IgG3 governs antibody oligomerization, increases functional affinity to multivalent antigens and enhances hemagglutination. *Front Immunol* (2018) 9:1096. doi: 10.3389/fimmu.2018.01096
64. Panka DJ. Glycosylation is influential in murine IgG3 self-association. *Mol Immunol* (1997) 34(8-9):593–8. doi: 10.1016/S0161-5890(97)00080-1
65. Strait RT, Posgai MT, Mahler A, Barasa N, Jacob CO, Köhl J, et al. IgG1 protects against renal disease in a mouse model of cryoglobulinaemia. *Nature* (2015) 517(7535):501–4. doi: 10.1038/nature13868
66. Abdelmoula M, Spertini F, Shibata T, Gytoku Y, Luzuy S, Lambert PH, et al. IgG3 is the major source of cryoglobulins in mice. *J Immunol* (1989) 143(2):526–32.
67. Klaus T, Bzowska M, Kulesza M, Kabat AM, Jemioła-Rzemińska M, Czaplicki D, et al. Agglutinating mouse IgG3 compares favourably with IgMs in typing of the blood group B antigen: functionality and stability studies. *Sci Rep* (2016) 6:30938. doi: 10.1038/srep30938
68. Takahashi S, Itoh J, Nose M, Ono M, Yamamoto T, Kyogoku M. Cloning and cDNA sequence analysis of nephritogenic monoclonal antibodies derived from an MRL/lpr lupus mouse. *Mol Immunol* (1993) 30(2):177–82. doi: 10.1016/0161-5890(93)90089-t
69. Lemoine R, Berney T, Shibata T, Fulpius T, Gytoku Y, Shimada H, et al. Induction of “wire-loop” lesions by murine monoclonal IgG3 cryoglobulins. *Kidney Int* (1992) 41(1):65–72. doi: 10.1038/ki.1992.9
70. Takahashi S, Nose M, Sasaki J, Yamamoto T, Kyogoku M. IgG3 production in MRL/lpr mice is responsible for development of lupus nephritis. *J Immunol* (1991) 147(2):515–9.
71. Giles BM, Tchepeleva SN, Kachinski JJ, Ruff K, Croker BP, Morel L, et al. Augmentation of NZB autoimmune phenotypes by the Sle1c murine lupus susceptibility interval. *J Immunol* (2007) 178(7):4667–75. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4667

## COPYRIGHT

© 2022 Carreón-Talavera, Santana-Sánchez, Fuentes-Pananá, Legorreta-Haquet, Chávez-Sánchez, Gorocica-Rosete and Chávez-Rueda. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00249

Matrícula: 2193801662

SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS T FOLICULARES Y B DE CENTRO GERMINAL EN RATONES MRL/1pr.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 24 del mes de octubre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DR. ROXANA URI MIRANDA LABRA
- DR. EZEQUIEL MOISES FUENTES PANANA
- DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: PAOLA SANTANA SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



PAOLA SANTANA SANCHEZ  
ALUMNA

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DR. EZEQUIEL MOISES FUENTES PANANA

SECRETARIA

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ