



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PROLACTINA
EN LA TOLERANCIA DEL LINFOCITO B EN RATONES QUE
DESARROLLAN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ROCÍO FLORES FERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DR. EZEQUIEL MOISES FUENTES PANANA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. JORGE MORALES MONTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD DE MEXICO, JULIO 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice	página
Índice de figuras	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Planteamiento de problema	19
Hipótesis	19
Objetivo General	20
Objetivo Particulares	20
Material y Métodos	21
Resultados	29
Discusión	52
Conclusiones	58
Referencias	59

Índice de figuras	página
Figura 1. Maduración y diferenciación de linfocito B	8
Figura 2. Mecanismos de tolerancia del linfocito B	9
Figura 3. Lupus eritematoso sistémico (LES)	10
Figura 4. Prolactina (PRL)	12
Figura 5. Señalización del receptor de PRL	13
Figura 6. Efectos de la PRL en el sistema inmune	15
Figura 7. PRL en pacientes con LES	16
Figura 8 . Efecto de la PRL en la producción de anticuerpos en ratones que desarrollan LES	17
Figura 9. Efecto de la PRL en el número de linfocitos B inmaduros y transitorios en ratones que desarrollan LES	18
Figura 10. Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231	29
Figura 11. Purificación de las células WEHI-231 receptor de PRL ⁺	30
Figura 12. Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231	31
Figura 13. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por Anexina V	32
Figura 14. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3	33
Figura 15. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en células WEHI-231	34
Figura 16. Efecto de la PRL en la activación de la vía PI3K-AKT en células WEHI-231	35
Figura 17. Efecto de la PRL en la activación de la vía de señalización JAK-STAT en células WEHI-231	36
Figura 18. Efecto de la PRL en la fosforilación de ERK en células WEHI-231	37
Figura 19. Unión de STAT-3P a sitios promotores de genes anti-apoptóticos en células WEHI-231	38

Figura 20. Efecto de la señalización del receptor de PRL en la apoptosis de células WEHI-231	39
Figura 21. Expresión Relativa de la isoforma larga del receptor de PRL	40
Figura 22. Efecto de la PRL en la viabilidad de linfocitos B inmaduras	42
Figura 23. Efecto de la PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros	43
Figura 24. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en linfocitos B inmaduros	44
Figura 25. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en linfocitos B	45
Figura 26. Efecto de la PRL la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en linfocitos B inmaduros	46
Figura 27. Efecto de la PRL en la fosforilación de STAT-1 y STAT-5 en linfocitos B inmaduros	47
Figura 28. Efecto de la PRL en la activación de STAT-3 en linfocitos B	48
Figura 29. Efecto de la PRL en la fosforilación de ERK en linfocitos B	49
Figura 30. Unión de STAT-3P a sitios promotores de genes anti-apoptóticos en linfocitos B inmaduros	50
Figura 31. Efecto de la señalización del receptor de PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros	51
Figura 32. Mecanismo de acción de la PRL en linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES	58

Resumen

La ontogenia del linfocito B se inicia en médula ósea, donde las células precursoras pasan por distintos estadios de maduración hasta el linfocito B inmaduro, en este estadio se elimina la mayor parte de clonas autorreactivas por mecanismos de tolerancia central. Se sabe que el receptor de PRL se expresa en todos los estadios de maduración del linfocito B, y que el incremento de los niveles séricos de PRL se asocia con una disminución en el número de linfocitos B inmaduros de médula ósea y un aumento en linfocitos B transitorios en ratones que desarrollan lupus eritematoso sistémico (LES), sugiriendo que la PRL podría estar participando en el punto de control donde se eliminan las clonas autorreactivas. LES es una enfermedad autoinmune que afecta predominantemente a mujeres en edad reproductiva, lo que se relaciona con la actividad de las hormonas como la prolactina. La unión de la PRL a su receptor induce la dimerización del mismo, activando las vías de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT. En el ratón se han descrito cuatro isoformas del receptor de PRL. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la prolactina en la tolerancia del linfocito B en médula ósea, así como determinar qué isoforma expresa y cómo señala a través del receptor de prolactina en estas células.

Para ello se emplearon linfocitos B inmaduros (línea celular WEHI-231 y provenientes de ratón MRL/lpr) en los que se determinó la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL mediante PCR tiempo real. Estas células fueron incubadas una hora con PRL y posteriormente se entrecruzó el BCR con un anticuerpo anti-IgM F(ab)₂. La viabilidad y la apoptosis de las células se determinaron mediante citometría de flujo. También se evaluó la expresión de genes de apoptosis mediante PCR Array. Además, se determinó la fosforilación de las moléculas STAT-1, STAT-3, STAT-5, AKT y ERK mediante citometría de flujo, y finalmente se realizaron ensayos de CHIP para determinar la unión de STAT-3 a los sitios promotores de los genes anti-apoptóticos. Todos los ensayos descritos también fueron realizados usando un inhibidor del receptor de PRL (G129R).

Los resultados obtenidos muestran que los linfocitos B inmaduros expresaron únicamente la isoforma larga del receptor de PRL. Cuando estas células son incubadas con PRL y después se entrecruza el BCR, aumentó la sobrevivencia y disminuyó la apoptosis. Además, la PRL incrementó la expresión de genes anti-apoptóticos principalmente de la familia Bcl-2, así como Birc5. También determinamos que la unión de la PRL a su receptor promueve la fosforilación de STAT-3 en ambos modelos y la fosforilación de AKT solo en células WEHI-231; todos estos resultados al usar el inhibidor del receptor de PRL se vieron revertidos. Finalmente confirmamos que STAT-3-P se une a las regiones promotoras de los genes anti-apoptóticos que se incrementaron por la unión de la PRL a su receptor. Con estos resultados sugerimos que la PRL rescata a las células B inmaduras de la apoptosis inducida por BCR, a través de la señalización de la isoforma larga del receptor de PRL, lo cual induce la activación de las vías de señalización PI3K-AKT y JAK-STAT-3. Esto promueve la transcripción de genes anti-apoptóticos debido a que el factor de transcripción STAT-3 se unió a los sitios promotores de estos genes.

Derivado de lo anterior, sugerimos que en el ratón con LES, el mecanismo por el cual los linfocitos B inmaduros evitan la apoptosis se encuentra basado en la unión de la PRL a su receptor largo y en la regulación de la activación de las vías de señalización PI3K-AKT y JAK-STAT-3.

Abstract.

The ontogeny of the B lymphocyte begins in bone marrow, where the precursor cells pass through different stages of maturation until immature B lymphocyte, in this stage most of the self-reactive clones are eliminated by central tolerance mechanisms. It is known that the PRL receptor is expressed in all stages of B cell maturation, and that the increase in serum levels of PRL is associated with a decrease in the number of immature B cells of bone marrow and an increase in transitional B cells in mice that develop systemic lupus erythematosus (SLE), suggesting that the PRL could be participating in the control point where autoreactive clones are eliminated. LES is an autoimmune disease of unknown etiology that predominantly affects women of reproductive age, which is related to the activity of hormones such as prolactin. Prolactin (PRL) is a globular protein composed of 199 amino acids, while the PRL receptor belongs to the family of type I cytokine receptors. Four isoforms have been described in the mouse and the binding of PRL with its receptor induces the dimerization of the same, initiating the signaling cascade, which activates JAK-STAT, MAPK and PI3K-AKT. The aim of this work was to evaluate the effect of prolactin on the tolerance of B lymphocyte in bone marrow, and determine what isoform expresses and how it signals the prolactin receptor in these cells. The expression of the isoforms of the PRL receptor was determined in immature B lymphocytes (cell line WEHI-231 and from mouse) by real-time PCR. These cells were incubated one hour with PRL and subsequently the BCR was cross-linked with an antibody (anti-IgM), the viability and apoptosis of the cells were determined by flow cytometry. The expression of apoptosis genes was determined by PCR Array. The phosphorylation of the STAT-1, STAT-3, STAT-5, AKT and ERK molecules was determined by flow cytometry. The CHIP was performed to determine the binding of STAT-3 to the promoter sites of the genes anti-apoptotic. All the assays were performed using an inhibitor of the PRL receptor (G129R). The results obtained show that the immature B cells only expressed the long isoform. When these cells are incubated with PRL and then the BCR was cross-linked, the survival increased, and the apoptosis of these cells decreased. The PRL

increased the expression of anti-apoptotic genes mainly of the Bcl-2 family and Birc5. Determined that the binding of PRL to its receptor promotes the phosphorylation of STAT-3 in both models and the phosphorylation of AKT only in WEHI-231 cells; All these results when using the PRL receptor inhibitor were reversed. Finally, we confirmed that STAT-3-P binds to the promoter regions of anti-apoptotic genes that were increased by the PRL. With these results we conclude that PRL rescues immature B cells from apoptosis, by the long isoform of the PRL receptor. This induces the activation of PI3K-AKT and JAK- STAT-3. In addition, the binding of PRL to its receptor promoted the transcription of anti-apoptotic genes, this increase was due to the transcription factor STAT-3, who joins to the promoter sites of the anti-apoptotic genes. With this work we demonstrate the mechanism by which immature B lymphocytes are rescue from apoptosis due to the binding of PRL to its receptor in mice that develop SLE.

Introducción.

Diferenciación y maduración del linfocito B.

La ontogenia del linfocito B inicia en médula ósea a partir de una célula troncal hematopoyética (HSC), la cual se diferencia a un progenitor linfoide temprano (ELP) y este da lugar al progenitor linfoide común (CLP), el cual puede comprometerse a

linaje de linfocito B (1,2). Durante el proceso de compromiso a linfocito B se requiere de distintos factores de transcripción como E2A, EBF y Pax5 (3,4); además los factores de transcripción Ikaros y PU.1, y las moléculas CXCL12, FTL3, SDF-1 y BAFF que son importantes durante la diferenciación de los linfocitos B en médula ósea (5-9). Los distintos estadios de maduración del linfocito B en médula ósea se pueden diferenciar por la expresión de moléculas de superficie (fenotipo) y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y cadena ligera (IgL) (10,11). 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. A este proceso se le conoce como recombinación V(D)J y es mediado por las proteínas RAG1/RAG2 (del inglés, recombinase activating gene 1 and 2) (12,13). El primer estadio denominado pro-B, se caracteriza por presentar un fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁻CD43⁺CD25⁻CD23⁻. En este estadio se rearreglan los segmentos D-J de la cadena IgH y posteriormente el segmento V-D-J, dando lugar a un rearreglo funcional VDJ, esto da lugar a la síntesis de la cadena IgH y a su expresión en superficie, la cual se asocia con la cadena ligera subrogada (λ 5 y VpreB), a lo cual se le conoce como pre-BCR (10,14). La formación del pre-BCR marca la transición hacia el estadio pre-B, este receptor tiene dos funciones; la primera es asegurar que no se expresen dos cadenas IgH con diferente especificidad en la misma célula, a tal proceso se denomina exclusión alélica, y la segunda función es iniciar el rearreglo de los genes VJ de la cadena IgL. (15). Los linfocitos pre-B tienen un fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁻CD43⁻CD25⁺CD23⁻, se subdividen en linfocitos pre-B "grandes", los cuales a través de la señalización del pre-BCR junto con la del receptor de IL-7 proliferan para aumentar el número de células que tienen éxito en la recombinación de la cadena IgH, posteriormente se diferencian hacia linfocitos pre-B "pequeños" en donde se lleva la recombinación de genes de la cadena IgL, paso importante para continuar con la diferenciación del linfocito B (10, 16,17). El rearreglo exitoso y la expresión de la cadena IgL, la cual se asocia con la cadena IgH previamente sintetizada para formar el BCR, marca la transición al estadio de linfocito B inmaduro, los cuales se caracterizan por la expresión de

B220⁺CD93⁺IgM⁺CD43⁻CD25⁻CD23⁻ y se sabe que en este estadio de maduración las células son sometidas a selección positiva y negativa (10, 18). La salida de los linfocitos B inmaduros de médula ósea a la periferia es regulada por el receptor para esfingosina-1-fosfato (S1P) y a estos linfocitos que emigran de médula ósea se les denomina linfocitos B transitorios, los cuales tienen una vida media corta y expresan el marcador AA4 (CD93) (19,20). Estas células migran a bazo para terminar su maduración a linfocitos B maduros de Zona Marginal (ZM) o Foliculares (FO), la supervivencia de estas células depende de la interacción BAFF-BAFFR (Figura 1) (21).

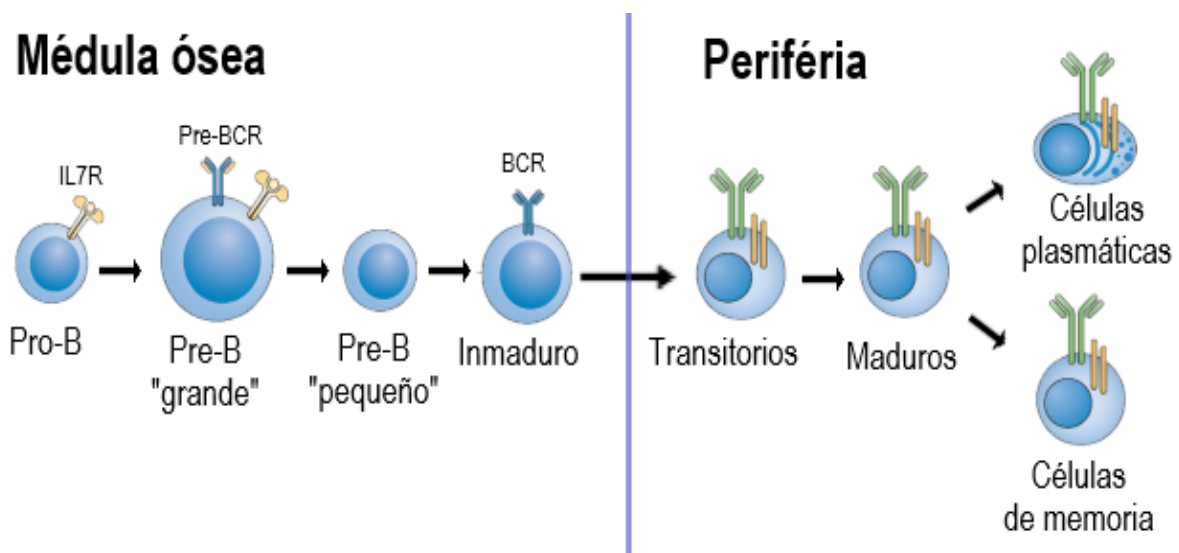


Figura 1. Maduración y diferenciación de linfocito B. La ontogenia del linfocito B inicia en médula ósea en donde encontramos los estadios de maduración Pro-B, Pre-B e inmaduros. Estos últimos salen a periferia como linfocitos B transitorios que se diferencian a linfocitos B maduros para finalmente terminar su maduración a células plasmáticas o células B de memoria (10,11).

A lo largo de todo este proceso de maduración y diferenciación de los linfocitos B se pueden generar clones autorreactivos, para evitar esto existen mecanismos de tolerancia central y periférica (22-24). La tolerancia central se lleva a cabo en médula ósea y es mediada por los mecanismos de edición del receptor que consiste en cambiar la especificidad del fragmento variable de la cadena IgL, con lo cual el BCR autorreactivo es remplazado por uno no autorreactivo (25,26) y en la delección clonal que consiste en la eliminación de clones autorreactivos por apoptosis, este

mecanismo se da cuando la edición del receptor falla (24, 27). Se estima que aproximadamente el 85% de los linfocitos B inmaduros recién formados son capaces de reconocer autoantígenos, y estas clonas son eliminadas por dichos mecanismos. Las células autorreactivas que logran continuar su desarrollo en órganos linfoides secundarios son sometidas a los mecanismos de tolerancia periférica mediante delección clonal y anergia, que consiste en la falta de respuesta de las clonas autorreactivas (28). Figura 2. La falla en la eliminación de clonas autorreactivas en conjunto con otros factores contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES/LESG) (Figura 2) (29-33).

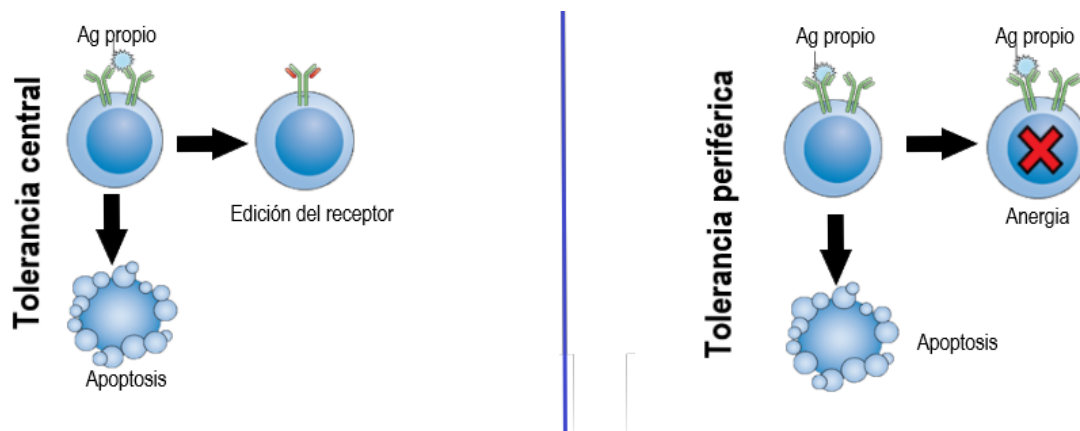


Figura 2. Mecanismos de tolerancia del linfocito B. A lo largo del proceso de maduración y diferenciación del linfocito B, existen diversos puntos de control para la eliminación de clonas autorreactivas mediante mecanismo de tolerancia central (edición del receptor y apoptosis) y periférica (apoptosis y anergia) (22-24).

Lupus Eritematoso Sistémico

LES es una enfermedad crónica autoinmune que puede afectar prácticamente cualquier órgano o sistema del organismo, se desconoce la etiología de esta enfermedad (34-36). Los pacientes con LES presentan defectos en los mecanismos de tolerancia (29,37,38) dando lugar a la aparición de clonas autorreactivas tanto de linfocitos T como de B. Existe una hiperactividad por parte de los linfocitos B que se identifica por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra diversas moléculas

del núcleo como el DNA, RNA, Ro, La, histonas, etc. La excesiva producción de autoanticuerpos resulta en la formación de complejos inmunes que se depositan en tejidos como piel, riñón, vasos sanguíneos, pulmón o cerebro causando inflamación y daño tisular (39-41). La actividad de LES tiene períodos de remisiones y exacerbaciones y sus manifestaciones clínicas más comunes son: la glomerulonefritis, el desarrollo de exantemas, la artritis, la vasculitis, mialgias y los desórdenes neuropsiquiátricos (Figura 3) (41-43).

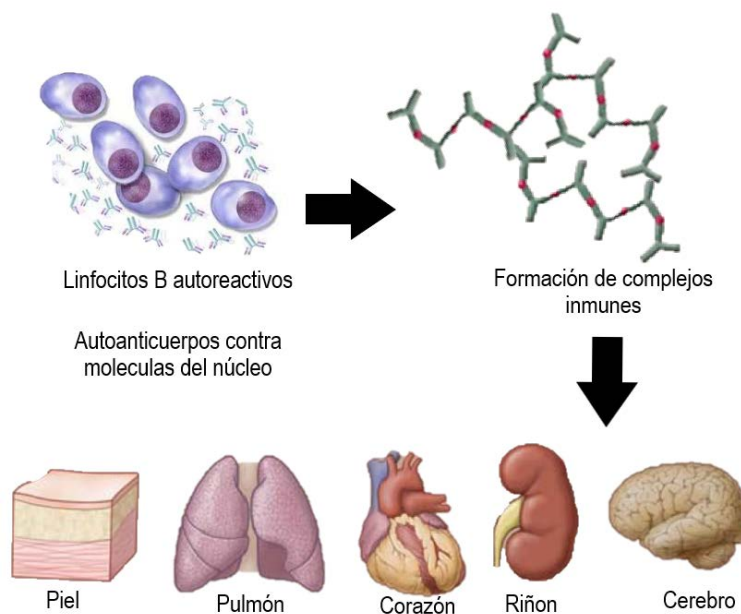


Figura 3. Lupus eritematoso sistémico (LES). LES es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por la presencia de células B autorreactivas, las cuales secretan autoanticuerpos principalmente contra moléculas del núcleo, los cuales forman inmunocomplejos y se depositan en diferentes órganos causando las manifestaciones de la enfermedad (41,42).

Se han empleado modelos de ratón para entender la fisiopatogenia de LES. Entre las cepas que desarrollan LES de manera espontánea se encuentra la primera generación filial NZB/W (NZB/W F1), que se caracteriza por la presencia de títulos elevados de autoanticuerpos, desarrollo de esplenomegalia y glomerulonefritis. La cepa de ratones MRL surge de varias cruces entre ratones de las cepas C57BL/6, LG/J, C3H/Di, y AKR/J, se caracteriza por presentar glomerulonefritis, depósitos de

complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergammaglobulinemia y producción de anticuerpos antinucleares principalmente dirigidos contra DNA de doble cadena (dsDNA). Mientras que la cepa MRL/lpr, tiene una mutación en la molécula Fas, y es esto lo que hace que la enfermedad en estos ratones aparezca tempranamente y de forma más agresiva. Estas cepas se han empleado para evaluar la relevancia que tienen los linfocitos B en el desarrollo de lupus (44-47).

Se desconoce la etiología de LES, se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, ambientales, hormonales, inmunológicos y epigenéticos tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer:hombre de 9: 1) entre la pubertad y la menopausia, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunostimuladoras de las hormonas, como la prolactina (PRL) (48,49).

Prolactina y su receptor

La PRL es una proteína globular compuesta de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intracadena, la cual forma una estructura tridimensional de 4 α -hélices antiparalelas (figura 4). Esta hormona es producida por las células de la hipófisis anterior y de manera extra hipofisiaria por endometrio, médula ósea, bazo, células epiteliales mamarias, linfocitos T y B entre otros. Su liberación es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo y por diferentes fármacos como la domperidona y metoclopramida; es inhibida por dopamina y por sus agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina. Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales se pueden clasificar en cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) crecimiento y desarrollo, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunorregulación, cada una de estas funciones dependerá del tipo celular en donde se exprese su receptor (50-52).

a) Prolactina



b) Unión PRL con su receptor

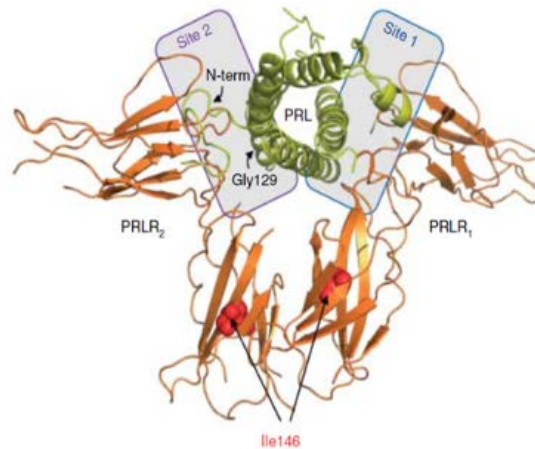


Figura 4. Prolactina (PRL). a) La PRL es una hormona peptídica de 199aa, que consta de 4 alfa-hélices antiparalelas y presenta dos sitios de unión a su receptor. b) La unión de la PRL a su receptor induce la dimerización de este (50,51).

Los efectos biológicos de la PRL son mediados por la interacción con su receptor, el cual pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I. Se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B (50,51). El receptor de PRL consta de tres dominios: extracelular que permite la unión al ligando, transmembranal e intracelular. Esta última región se caracteriza por la presencia de motivos de triptófano y serina; además de dos regiones conservadas conocidas como box-1 y box-2. A la región box-1 se une constitutivamente JAK-2, lo cual permite la señalización del receptor. Se han descrito diversas isoformas del receptor tanto en humano como en ratón, en este último se conocen 4 isoformas (una larga y tres cortas) idénticas en el dominio extracelular pero diferentes en tamaño y composición del dominio intracelular (52,53). El evento inicial de la señalización ocurre cuando una molécula de PRL se une a dos monómeros del receptor de PRL para inducir su dimerización y subsecuente activación. El receptor de PRL no tiene actividad intrínseca de tirosina-cinasa, pero en su dominio intracelular presenta tirosinas que son fosforiladas por cinasas que son reclutadas al activarse el receptor y que tiene como consecuencia el encendido de las vías de

señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K-AKT, las cuales inducen proliferación y supervivencia (figura 5 (54-56)).

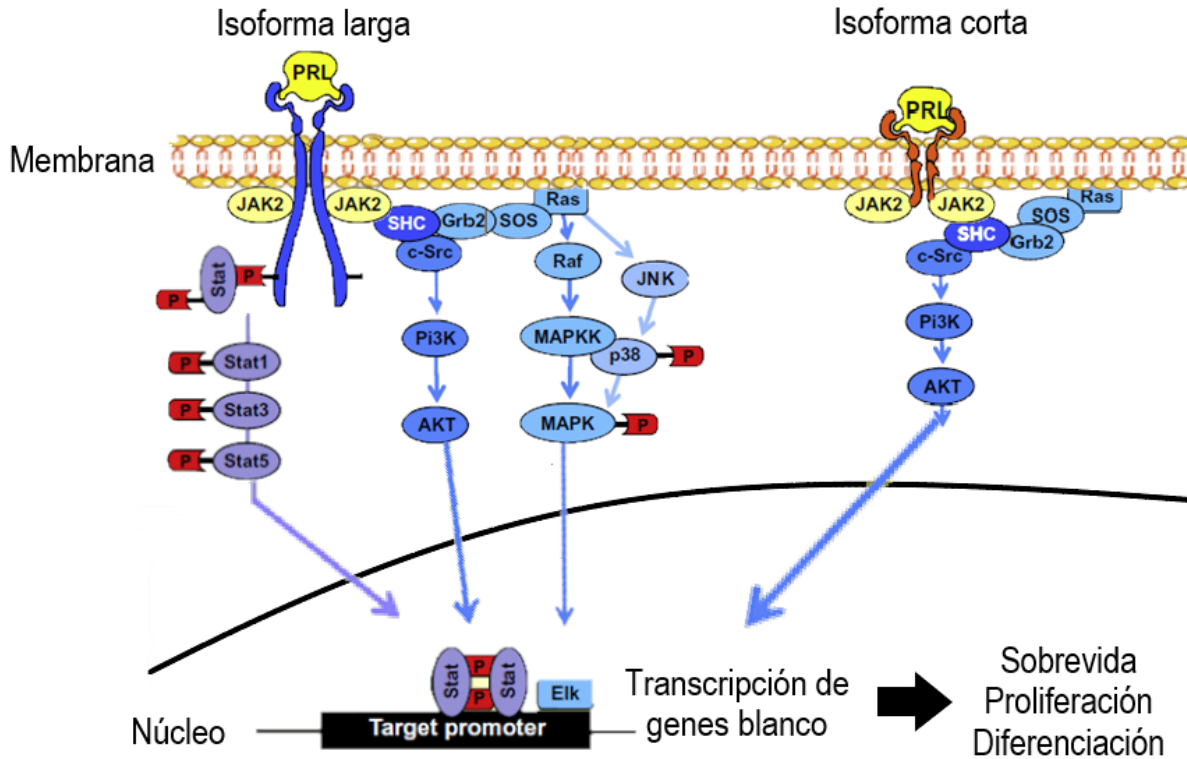


Figura 5. Señalización del receptor de PRL. Se han descrito las isoformas larga y corta del receptor de PRL, las cuales difieren en la composición y tamaño de la región citoplasmática. La unión de la PRL con su receptor induce la dimerización de este e inicia la señalización, la isoforma larga puede señalizar vía Stat, PI3K/AKT y MAPK, mientras que la isoforma corta solo señaliza vía PI3K/AKT y MAPK (53,54).

Tanto en humano como en ratón las isoformas del receptor de PRL se expresan de manera diferencial en diversos tejidos, lo que sugiere efectos distintos en cada tipo celular. En células endoteliales la PRL, a través de la unión a su receptor, activa las vías de señalización JAK-STAT-5 y ERK1/2 promoviendo angiogénesis (57). En glándula mamaria la PRL promueve proliferación, diferenciación y supervivencia a través de la señalización JAK-STAT5 y PI3K-AKT (58). En células de endometrio, la PRL es capaz de activar a JAK2 y a los STAT1 y STAT5 (59). Mientras que en células del sistema inmune como células NK, la PRL induce la activación de la vía

MAPK, en células N b2 activa la vía JAK-STAT5 y en macrófagos induce la señalización JAK-STAT1 y MAPK (60-62).

Prolactina y sistema inmune

La relación entre PRL y el sistema inmune se hizo evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (63). Posteriormente en 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina, un inhibidor de la producción de PRL (64). Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL a través de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α que actúan como reguladores paracrinós o endócrinos en la liberación o inhibición de PRL hipofisiaria (65-67).

En células del sistema inmune, como los macrófagos la PRL es capaz de aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12) (62,68). Por otro lado la PRL favorece la maduración de las células dendríticas provenientes del bazo de ratones incrementando la expresión de las moléculas MHC-II y CD40, además de incrementar la expresión a nivel de proteína de las citocinas IL-10, IL-6, IL12 y TNF- α (69). Mientras que en células NK la PRL induce un incremento en la síntesis de IFN- γ en respuesta a IL-2 (70).

Por otra parte en linfocitos T se ha descrito que la estimulación *in vitro* con PRL regula el proceso de maduración (ontogenia) de timocitos dobles negativos (CD4⁻CD8⁻) a dobles positivos (CD4⁺CD8⁺) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2 (71). En linfocitos T activados, la PRL regula positivamente la secreción de IL-2 y favorece la expresión de CD25 (72). En células T CD4⁺ activadas con PMA, la PRL autocrina es importante para mantener la expresión de CD69 y CD40L y la secreción de IL-2 e IFN- γ (73). Por otro lado, tanto en células T CD4⁺ como en líneas celulares, la PRL favorece la expresión del factor de transcripción T-bet a través de STAT5 (74), mientras que en las células T CD8⁺ activadas con fitohemaglutinina, la PRL incrementa la expresión de CD69 y CD25 (75).

Mientras que en linfocitos B; se sabe que la PRL aumenta la diferenciación de linfocitos pro-B ($B220^+CD43^+$) a pre-B ($B220^+CD43^-$) en ratones transfectados con el receptor de PRL (76). Además, en linfocitos B e hibridomas, la PRL incrementa la producción de anticuerpos (77,78). Figura 6.

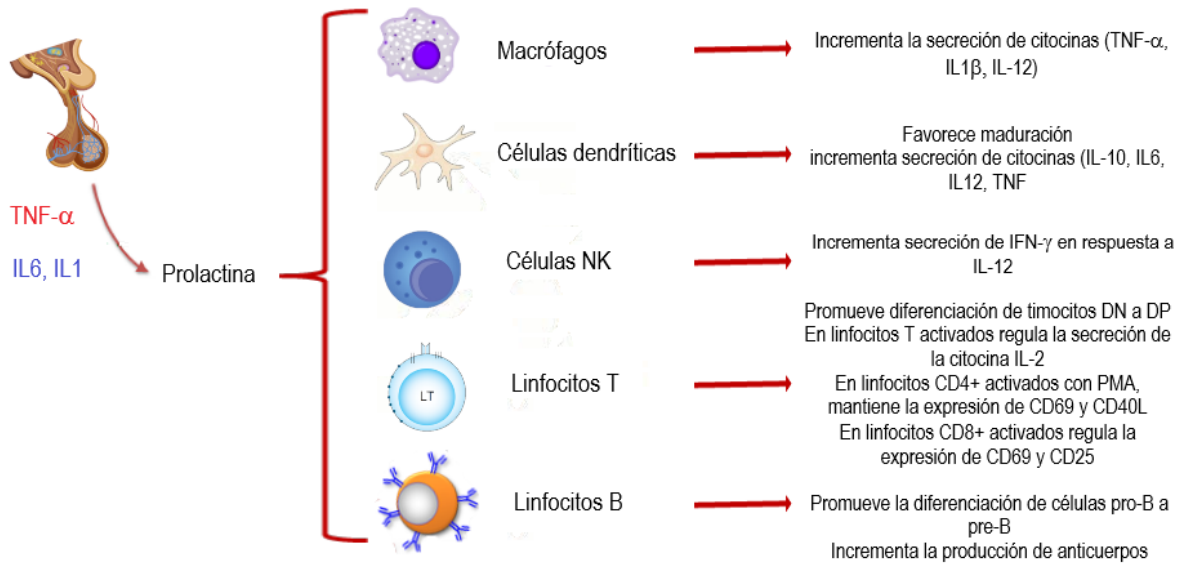


Figura 6. Efectos de la PRL en el sistema inmune. La secreción de PRL en la hipófisis es regulada por algunas citocinas; y esta PRL tiene efecto en distintas células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos T y B.

Por otro lado, en ratones con trasplante de médula ósea la administración de PRL recombinante induce un incremento en la linfopoyesis (79). Aunque en ratones “knock out” para PRL y su receptor no se encuentran defectos en la producción de los linfocitos (80,81). Estos resultados muestran que la PRL participa en el proceso de linfopoyesis. Sin embargo, su ausencia no es crítica y su participación en este proceso puede ser sustituida por otros factores redundantes.

Prolactina y LES

En enfermedades autoinmunes se han reportado niveles elevados de PRL, en LES se ha descrito que entre el 15 y 33% de pacientes con esta enfermedad presentan concentraciones séricas altas de PRL que correlacionan con la actividad de la enfermedad Figura 7(82-84).

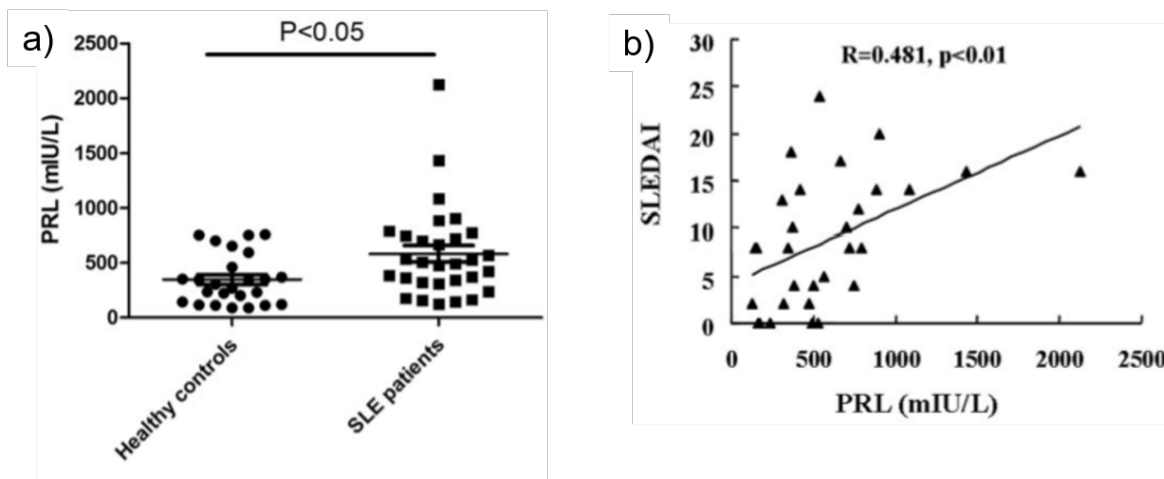


Figura 7. PRL en pacientes con LES. a) Pacientes con LES presentan niveles elevados de PRL en circulación y b) Los niveles de PRL en circulación correlacionan con la actividad de la enfermedad (SLEDAI) (83).

Los elevados niveles séricos de PRL en los pacientes con LES se han asociado con un polimorfismo de un solo nucleótido en el promotor del gen de PRL extra hipofisiaria (-1149G/T) y correlacionan con la concentración de autoanticuerpos (85, 86). En linfocitos T provenientes de pacientes con LES que fueron tratados con un mitógeno y un anticuerpo anti-PRL, se observó una disminución en la expresión de CD69 y CD154, lo cual sugiere que la PRL autocrina participa en la activación de estas células (87). Además, en pacientes con la enfermedad activa se ha observado que el porcentaje de células T reguladoras (encargadas de mantener la tolerancia) se encuentra disminuido (88).

Por otro lado, en modelos de ratón que desarrollan lupus como los NZB/NZW, el estado de hiperprolactinemia exagera la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana al presentar un incremento de proteinuria y secreción de anticuerpos IgG principalmente dirigidos contra DNA. En contraste, la inhibición de la secreción de PRL con bromocriptina incrementa la supervivencia en estos ratones (89,90). En los ratones MRL/lpr que también desarrollan LES, la inducción de hiperprolactinemia con metoclopramida exagera la enfermedad, observando un incremento en los anticuerpos anti-DNA de doble cadena (anti-DNA_{dc}) y en los

niveles de proteinuria (91). Mientras que en ratones BALB/c R4A- γ 2b los cuales son transgénicos para un anticuerpo patogénico dirigido contra DNA, pero no desarrollan lupus, al inducirles hiperprolactinemia el número de células B autorreactivas incrementa, así como el título de anticuerpos anti-DNA y depósito de complejos inmunes en glomérulo. (92,93).

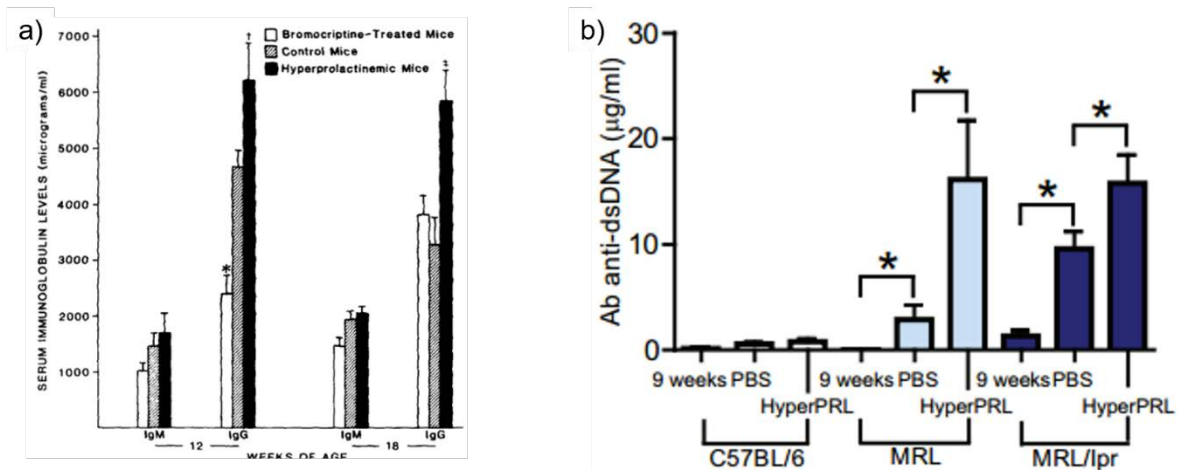


Figura 8. Efecto de la PRL en la producción de anticuerpos en ratones que desarrollan LES. a) Ratones NZB/W con niveles elevados de PRL incrementan la producción de anticuerpos IgG y b) Ratones MRL con niveles elevados de PRL incrementan la producción de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (90,91).

En el bazo de ratones BALB/c R4A- γ 2b con hiperprolactinemia se ha reportado que el porcentaje de linfocitos B transicionales tipo 1 (T1) disminuyó en comparación con los ratones tratados con el vehículo (94) e incrementó la expresión de genes anti-apoptóticos (95), sugiriendo que la PRL podría estar induciendo la supervivencia de las clonas autorreactivas en bazo. Además, en ratones C57BL/6 que contiene el intervalo S el3/5, el cual confiere sensibilidad a la PRL, en un estado de hiperprolactinemia, desarrollan lupus y presentan una disminución en el porcentaje de linfocitos B T1 y un incremento en T2 (96). Mientras que en ratones MRL y MRL/lpr que desarrollan lupus de forma espontánea todas las poblaciones de linfocitos B en médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduras) y bazo (T1, T2, T3, FO y MZ) expresan el receptor de PRL, encontrando patrones de expresión diferentes entre las cepas que desarrollan LES y la cepa control. En los ratones que

desarrollan LES y presentan niveles elevados de PRL en suero se encontró que el número absoluto de linfocitos B inmaduros esta disminuido y el número absoluto de linfocitos B T1 en bazo se encuentra aumentado (91,97).

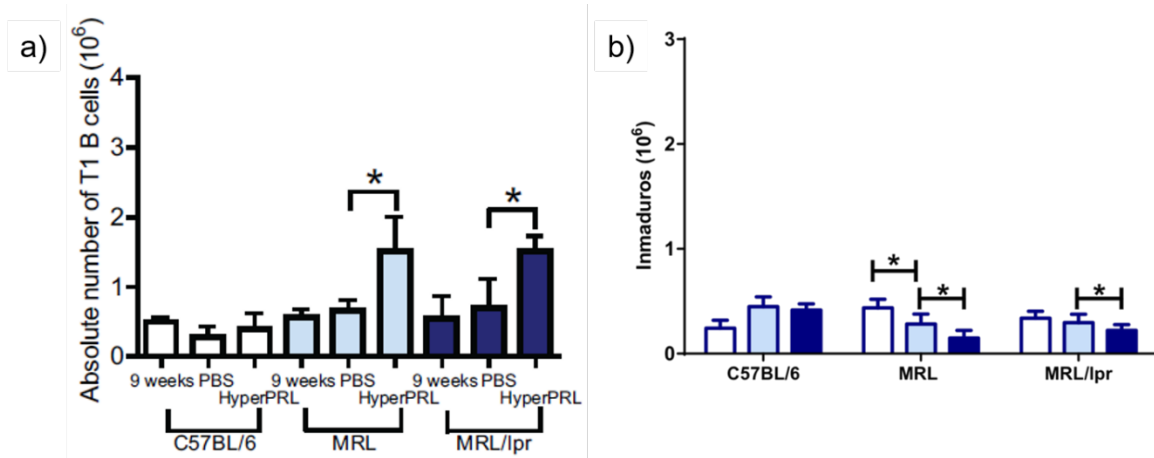


Figura 9. Efecto de la PRL en el número de linfocitos B inmaduros y transitorios en ratones que desarrollan LES. a) En ratones que desarrollan LES con niveles aumentados de PRL se observó un incremento en el número absoluto de linfocitos B transitorios (T1) mientras que b) se observó una disminución en el número absoluto de linfocitos inmaduros de médula ósea (91,97).

Planteamiento del problema.

Se sabe que las hormonas tienen un papel importante en el desarrollo del LES, niveles elevados de PRL correlacionan con la actividad de la enfermedad en pacientes y en modelos de ratón. Por otro lado, se ha demostrado que defectos en la tolerancia de los linfocitos B tienen como consecuencia la generación de clonas autorreactivas y la consecuente producción de autoanticuerpos, los cuales forman inmunocomplejos que se depositan en órganos vitales causando inflamación y daño. En ratones de las cepas MRL y MRL/lpr que desarrollan LES se ha demostrado que todos los estadios de maduración del linfocito B de médula ósea y bazo expresan el receptor de PRL. Sin embargo, se desconoce la isoforma que expresan. Además, cuando estos ratones presentan niveles elevados de PRL en suero se encontró una disminución en el número absoluto de linfocitos B inmaduros en médula ósea y un incremento en los linfocitos B T1 en bazo, puntos importantes para la eliminación de clonas autorreactivas. Por lo que surgen las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es el papel de la PRL y su receptor en la tolerancia del linfocito B en médula ósea?
2. ¿Qué isoforma del receptor de PRL se expresa en linfocitos B de médula ósea?
3. ¿Cuál es la vía de señalización que induce la PRL en linfocitos B inmaduros?

Hipótesis.

La PRL a través de la unión a su receptor rescatará a los linfocitos B inmaduros de la apoptosis en ratones que desarrollan LES.

Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar el mecanismo de acción de la prolactina en la tolerancia central del linfocito B inmaduro en ratones que desarrollan LES.

Objetivos específicos.

1. Determinar la expresión de las isoformas del receptor de PRL en los linfocitos B de médula ósea.
2. Determinar la participación de la PRL en la tolerancia del linfocito B inmaduro.
3. Determinar la vía(s) de señalización que inducen la activación del receptor de PRL en linfocitos B inmaduros.

Material y Métodos.

Diseño del proyecto.

Experimental, transversal

Línea celular.

Células WEHI-231 (ATCC), fueron mantenidas en medio RPMI (Hyclone, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, USA), antibióticos (Invitrogen, USA), piruvato de sodio (Hyclone, USA) y beta-mercaptoetanol (Invitrogen, USA). Se mantuvieron en incubación a 37°C y a 5% de CO₂.

Animales.

Se utilizaron ratones hembras de 9 semanas de edad de las siguientes cepas: A) C57BL/6 (Harlan, USA) y B) MRL/lpr (The Jackson Laboratory, USA). Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, en cajas de policarbonato de piso sólido con microaislador, con fotoperiodos de 12 horas de luz por día y temperatura del cuarto 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".

Hormona.

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

Inhibidor del receptor de PRL

El inhibidor del receptor de PRL es una molécula análoga a la PRL conocida como G129R, la cual fue proporcionado por Oncolix (USA).

Fármaco

Se empleó metoclopramida como inductor de hiperprolactinemia (Sigma Aldrich, USA).

Inducción de hiperprolactinemia.

Se formaron dos grupos por cada cepa de ratón con los siguientes tratamientos: I) 9 semanas II) administrados con 100 µl de metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 2 mg/ml disuelta en PBS. La administración del tratamiento se realizó durante 6 semanas por vías subcutánea (SC), llevando a cabo la administración por las mañanas de lunes a viernes.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti B220-perlas (clona RA3-6B2) de Miltenyi Biotec (Alemania), anti CD23-perlas de Miltenyi Biotec (Alemania), anti B220-PE (clona RA3-6B2), anti CD23-PE-Cy7 (clona B3B4), anti IgM-APC (clona 11/41), anti CD43-FITC (clona eBioR2/60) de eBioscience (USA) y anti-receptor de PRL policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA). También se emplearon los anticuerpos anti-IgM Fab biotinado y anti-IgM F(ab)₂ (Jackson ImmunoResearch, USA). El anticuerpo biotinado para determinar el receptor de PRL fue detectado con estreptavidina-PE-Cy5 (BD Biosciences, USA), y para el anti-IgM biotinado fue empleada la estreptavidina-APC (eBioscience, USA).

Obtención de células de médula ósea.

Los ratones de 9 semanas y los tratados con metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) fueron sacrificados por eutanasia. La médula ósea se obtuvo de fémur y tibia al inyectar dentro de los huesos medio RPMI f r í o (Thermo Scientific, USA) suplementado con BSA al 1% (MP Biomedicals, Francia) y EDTA 2 mM (IBI Scientific, USA). Las células se disgregaron con ayuda de una jeringa y pasaron por un colador de nylon 70 µm (BD Biosciences, USA), se centrifugaron (1,100 rpm/10 minutos), decantaron y lisaron los eritrocitos con 2 ml de regulador de lisis por 2 minutos (Sigma Aldrich, USA). Las células se lavaron con Medio RPMI-BSA 0.5%

EDTA 2 mM, se resuspendieron y se contaron con azul tripano (BioWhittaker) utilizando la cámara de Neubauer.

Purificación de poblaciones de linfocitos B de médula ósea por sort para determinar isoformas del receptor de PRL.

La purificación de los linfocitos B de médula ósea se realizó por selección positiva. Para lo cual las células provenientes de médula ósea se incubaron con anticuerpo anti-B220 conjugado a perlas magnéticas $10 \mu\text{l}$ por cada 10×10^6 de células (Miltenyi) en PBS-BSA 0.5% EDTA 2 mM a 4°C por 15 minutos, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi), los linfocitos B purificados se incubaron a 4°C por 20 minutos con los siguientes anticuerpos: $5 \mu\text{l}$ de anti-B220-PE, $5 \mu\text{l}$ de anti-CD23-PECy7, $5 \mu\text{l}$ de anti-IgM-APC, $5 \mu\text{l}$ de anti-CD43-FITC, así como con $5 \mu\text{l}$ de DAPI 1 mg/ml (Sigma Aldrich, USA) para seleccionar células vivas. La purificación de las poblaciones linfocitos B se realizó por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSAria con software FACSDiva (BD Bioscience).

Purificación de linfocitos B inmaduros por sort para ensayos de apoptosis

La purificación de los linfocitos B de médula ósea se realizó por selección positiva. Para lo cual las células provenientes de médula ósea se incubaron con anticuerpo anti-B220 conjugado a perlas magnéticas $10 \mu\text{l}$ por cada 10×10^6 de células (Miltenyi) en PBS-BSA 0.5% EDTA 2 mM a 4°C por 15 minutos, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi), los linfocitos B purificados se incubaron a 4°C por 20 minutos con los siguientes anticuerpos: $5 \mu\text{l}$ de anti-B220-PE, $5 \mu\text{l}$ de anti-CD23-PECy7, $5 \mu\text{l}$ de anti-IgM Fab biotinado, $5 \mu\text{l}$ de anti-CD43-FITC, para el anticuerpo biotinado se usó estreptavidina-APC, así como con $5 \mu\text{l}$ de DAPI 1 mg/ml (Sigma Aldrich, USA) para seleccionar células vivas. La purificación de los linfocitos B inmaduros se realizó por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSAria con software FACSDiva (BD Bioscience).

Purificación de linfocitos B220+CD23- para detección de fosfoproteínas

La purificación de los linfocitos B de médula ósea se realizó por selección positiva. Para lo cual las células provenientes de médula ósea se incubaron con anticuerpo anti-B220 conjugado a perlas magnéticas 10 μ l por cada 10×10^6 de células (Miltenyi) en PBS-BSA 0.5% EDTA 2 mM a 4°C por 15 minutos, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi), posteriormente los linfocitos B220+ se incubaron con anticuerpo anti-CD23 conjugado a perlas magnéticas 10 μ l por cada 10×10^6 de células (Miltenyi) en PBS-BSA 0.5% EDTA 2 mM a 4°C por 15 minutos, se lavaron y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi). Los linfocitos B220+CD23- obtenidos se usaron para los ensayos de señalización.

Purificación de células WEHI-231 receptor de PRL positivas

Las células WEHI-231 fueron incubadas en FACS buffer (PBS con BSA 0.5%) con anticuerpos acoplados a fluorocromos específicos para CD19 e IgM y para el receptor de PRL se usó un anticuerpo anti-receptor de PRL, un segundo anticuerpo biotinado y streptavidina-PECy5 por 20 minutos a 4 °C en oscuridad y con un marcador de viabilidad (Ghost-Red). Se realizó la selección de las células CD19+/IgM+/Ghost-Red-. La purificación de las células se realizó usando el equipo FACSAria (BD Biociencias). La pureza de las células fue mayor al 98%.

Extracción de RNA total y retrotranscripción (RT)

Las poblaciones de linfocitos B purificadas se colocaron en reactivo de Trizol (Invitrogen, USA) 1 ml por cada 1×10^6 células, se adicionó 10 μ l de glicógeno para visualizar el RNA y se incubaron 5 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de cloroformo (Sigma Aldrich, USA), se homogeneizó y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se adicionaron 550 μ l de isopropanol grado biología molecular (J.T Baker, USA) se incubó toda la noche a -70°C. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 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 por 10 minutos. El RNA se

resuspendió en 12 μ l de agua inyectable (PISA, México), se cuantificó y evaluó su pureza utilizando el espectrofotómetro GeneQuant Pro (Gemini BV, Holanda). El RNA se convirtió en cDNA, para lo cual a 0.5 μ g de RNA se le adiciono 1 μ l de oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ 0.5 mg/ml (Invitrogen) y agua inyectable para un volumen final de 11 μ l, la reacción se alineo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, USA) a 65°C por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 5 μ l del regulador 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 μ l de DTT 0.1M (Invitrogen, USA), 1 μ l dNTPs 10 mM (Invitrogen, USA) y 200U de la enzima Superscript III (Invitrogen, USA); se corrieron las muestras en el termociclador en un ciclo de 1 hora a 50°C y 15 minutos a 70°C. El cDNA obtenido se almacenó a -40°C.

PCR Array apoptosis

Se usaron las placas para genes de apoptosis de RT² Profiler™ PCR Array Mouse (Qiagen, Hilden, Alemania) con el formato 96-well Plate, el cual es compatible con el termociclador LightCycler 96 (Roche, Alemania). El procesamiento de la muestra se realizó en base a las instrucciones del fabricante con el uso de RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Hilden, Alemania). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa RT² Profiler PCR Array Data Analysis versión 3.5, el cual normalizó y generó el valor de expresión relativa.

PCR en tiempo real

Para determinar la expresión de las isoformas del receptor de PRL se realizó PCR tiempo real usando una mezcla sonda/iniciadores: para la β -actina (gen constitutivo) se colocó 0.1 μ M de sonda No.56 (Roche, Alemania) y 0.5 μ M de cada iniciador GAGGAGGCTCTGGTTCAACA (sentido) y CAGTAAATGCCACGAACGAA (antisentido) (Roche); para las isoformas del receptor de PRL colocó 0.1 μ M de la sonda No.31 (Roche) y 0.5 μ M de cada iniciador AAGCCAGACCATGGATACTGGAG (común-sentido), AGCAGTTCTTCAGACTTGCCCTT (larga-antisentido) TATTTGCTTGCAGAGCCAGT (corta-antisentido). Posteriormente se realizó la

mezcla de reacción en la cual se colocaron 1 μ l de la mezcla sonda/iniciadores, 2 μ l de Master Mix: 25 U Taq DNA Polimerasa, 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, Brij 35 0.01% v/v, dNTPs 0.4 mM, pH 8.3 (Roche), 4.5 μ l de agua inyectable (PISA) y 2.5 μ l de muestra. Las muestras se corrieron en el termociclador LightCycler II (Roche) bajo las siguientes condiciones:

95°C x 15 minutos } 1 ciclo
 95°C x 10 segundos }
 61°C x 30 segundos } 40 ciclos
 72°C x 01 segundos }
 50°C x 30 segundos } 1 ciclo

El análisis de la expresión relativa del receptor de PRL se realizó usando la fórmula $2^{\Delta\Delta CT}$, como se muestra a continuación:

$$\Delta CT1 = C_p (\text{receptor de PRL}) - C_p (\beta - \text{actina})$$

$$\Delta\Delta = \Delta CT1 - (\Delta \text{ problema})$$

$$\text{Expresión relativa} = \frac{1}{e^{-(\Delta\Delta)}}$$

Apoptosis

Las células WEHI-231 receptor de PRL positivas y las células B inmaduras de ratones C57BL/6 y MRL/lpr fueron preincubadas 1 hora con PRL (50 ng/ml) y posteriormente se estimularon con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ de Jackson ImmunoResearch (10 μ g/ml) durante 48 horas y 18 horas respectivamente. Como controles se usaron células solo con medio, células sólo con PRL y células solo con anti-IgM F(ab')₂. Al finalizar el tiempo de incubación se lavó con PBS y se adicionó el marcador de viabilidad Ghost-Red durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Posteriormente las células se dividieron en dos, las primeras fueron marcadas con Anexina V -FITC según el protocolo del proveedor y las segundas fueron permeabilizadas con 100 μ l de Citofix/Citoperm de BD Biosciences durante 1 hora a 4°C después las células se lavaron con Permash de BD Biosciences y marcadas con anti-caspasa 3 activa acoplado a FITC 1 hora a 4°C en oscuridad. Finalmente,

las muestras fueron adquiridas en el citómetro MACSQuant Analyzer 10 y analizadas en el software Flowjo.

Detección de fosfoproteínas.

Las células WEHI-231 y las células B220+CD23- provenientes de ratones C57BL/6 y MRL/lpr fueron incubadas 30 minutos con el inhibidor de PRL (Inh-PRL 10 µg/ml) y con inhibidores de las vías de señalización del receptor de PRL como GSK (inhibidor de la fosforilación de Akt), PP2 (inhibidor de cinasas de la familia Src) y Stattic (inhibidor de Stat3); posteriormente se incubaron con PRL (50 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijaron por 10 min a temperatura ambiente con 50 µl de paraformaldehído 2 %. Las células se marcaron con anti-CD43-FITC y anti-IgM-APC, posteriormente se permeabilizaron con 100 µl de Perm Buffer II de BD Phosflow para los STATs y con 100µl de IC Fixation Buffer de eBioscience, para AKT y ERK durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se lavaron con FACS buffer o con Permash respectivamente; y se incubaron con los siguientes anticuerpos anti-STAT1-PE, anti-STAT3-PE, anti-STAT5-PE, anti-AKT-PE y anti-ERK-PE durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, finalmente se lavaron y se resuspendieron con FACS Buffer. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro MACSQuant Analyzer 10 y analizadas en el software Flowjo.

Inmunoprecipitación de cromatina ChIP

Las células WEHI-231 y los linfocitos B inmaduros (obtenidos por sort) fueron incubados 1 hora con PRL, posteriormente se siguió el protocolo EpiTect ChIP OneDay Kit (Qiagen), para la inmunoprecipitación (IP) se usaron los anticuerpos anti-IgG y anti-Stat-3-P de Cell Signalling. Para determinar el % de Input se utilizó la siguiente fórmula:

$$\Delta CT(\text{normalizado IP}) = C_p(\text{IP}) - C_p(\text{input}) - \text{Log}_2(\text{factor de dilucion del input})$$
$$\% \text{ Input} = 2(-\Delta CT(\text{normalizado IP}))$$

Análisis estadístico.

Los resultados se describirán de acuerdo a la distribución de los datos (promedio y desviación). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de t pareada. Las diferencias entre grupos se determinaron utilizando la prueba ANOVA. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 15.

Resultados

Expresión de la isoforma del receptor de PRL en células WEHI-231

Las WEHI-231 han sido ampliamente usadas para el estudio de la tolerancia del linfocito B, ya que estas células expresan un fenotipo B inmaduro punto importante de control para la eliminación de clones autorreactivos, por lo que se decidió utilizarlas como modelo de estudio, para lo cual primero se determinó la expresión del receptor de PRL a nivel de mRNA usando iniciadores para detectar la porción extracelular, común en todas las isoformas; encontrando que las células WEHI-231 expresan el receptor (0.51 ± 0.05 expresión relativa). Posteriormente se determinó la expresión de las isoformas usando un iniciador común y un iniciador específico para cada isoforma (larga y corta). Las células WEHI-231 solo expresan la isoforma larga del receptor de PRL (0.51 ± 0.04 expresión relativa) como se muestra en la figura 10a. También se determinó la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína mediante el marcaje con un anticuerpo que reconoce la porción extracelular del receptor, encontrando que $47.50 \pm 5.36\%$ de las células WEHI-231 expresan el receptor de PRL (Figura 10b).

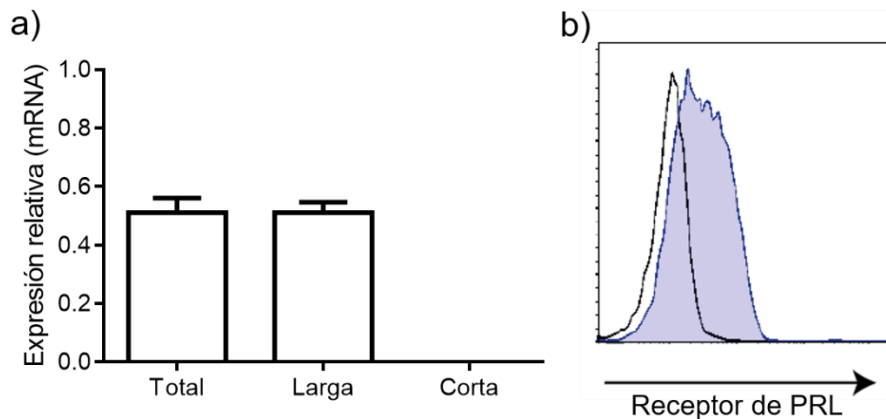


Figura 10. Expresión del receptor de PRL en células WEHI-231. Se determinó la expresión relativa del receptor de PRL y sus isoformas en células WEHI-231 a) Mediante RT-PCR tiempo real y b) Mediante citometría de flujo

Para asegurar el efecto de la PRL sobre estas células, se realizó la purificación de las células WEHI-231 PRLR+ mediante citometría de flujo, usando la estrategia que se muestra en la figura 11, obtenido puridades entre el 95-98%. Los ensayos posteriores de apoptosis se realizaron con las células WEHI-231 receptor de PRL+.

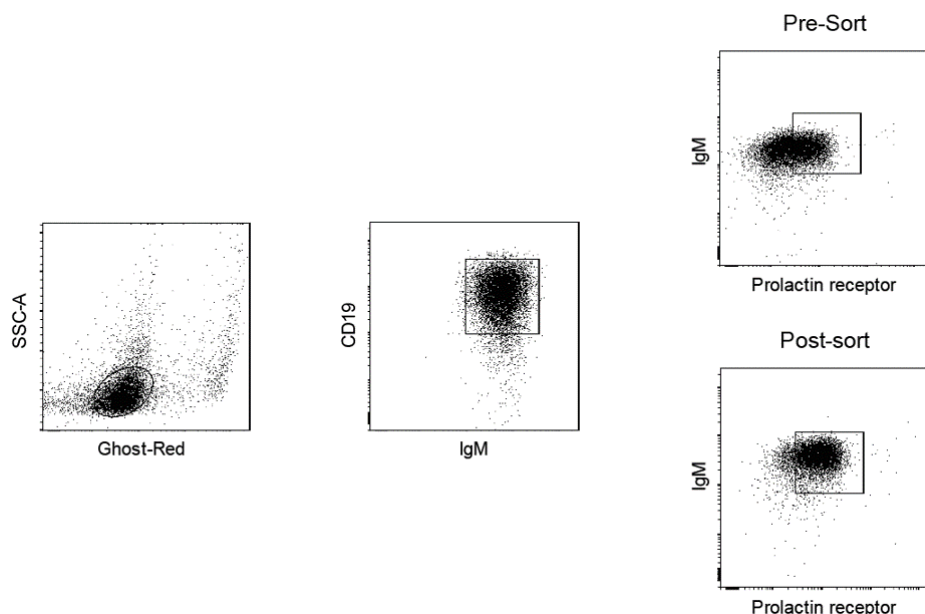


Figura 11. Purificación de las células WEHI-231 receptor de PRL+. Mediante citometría de flujo se realizó la purificación de las células WEHI-231 positivas para el receptor de PRL (Ghost-Red-/CD19+/IgM+/Receptor de PRL+).

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

Para determinar el efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis en las células WEHI-231, las células fueron pre-incubadas 1 hora con PRL y 48 horas con un anticuerpo anti-IgM F (ab')₂ para inducir entrecruzamiento de IBCR, lo cual mimetiza el entrecruzamiento de antígenos propios. El porcentaje de células vivas y en apoptosis fue determinado mediante citometría de flujo. Las células que fueron incubadas con anti-IgM F (ab')₂ mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células vivas ($40.93 \pm 0.87\%$; $p < 0.01$) comparada con las células incubadas con medio ($65.72 \pm 1.96\%$) o PRL ($67.10 \pm 5.90\%$). Mientras que las células que fueron pre-incubadas con PRL e incubadas con anti-IgM F (ab')₂

mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células vivas ($58.42 \pm 0.82\%$; $p < 0.01$) comparado con las células que no fueron pre-incubadas con PRL (Figura 12).

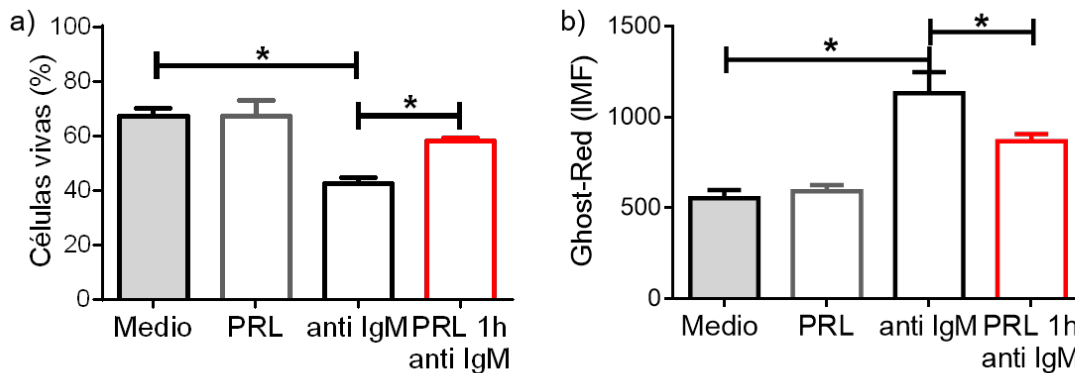


Figura 12. Efecto de la PRL en la viabilidad de células WEHI-231. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti-IgM $F(ab')_2$ por 48 horas. Las células muertas fueron marcadas con Ghost-Red. a) Porcentaje de células vivas y b) IMF Ghost-Red. * $p < 0.01$

Las células en apoptosis fueron determinadas mediante dos diferentes parámetros: 1) Anexina V y Ghost-Red (marcador de sobrevivencia) y 2) caspasa-3 activa. El porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V⁺/Ghost-Red⁻) y apoptosis tardía (Anexina V⁺/Ghost-Red⁺) incrementó significativamente en las células incubadas con anti-IgM $F(ab')_2$ (23.88 ± 2.56 and $31.62 \pm 2.66\%$; $p < 0.01$) comparado con el porcentaje de células incubadas con medio (16.23 ± 2.02 and $14.28 \pm 0.71\%$) o PRL (15.37 ± 0.97 and $13.0 \pm 0.44\%$). Una disminución significativa en el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía (14.44 ± 0.99 and $21.92 \pm 2.00\%$; $p < 0.01$) fue determinada en las células pre-incubadas con PRL e incubadas con anti-IgM $F(ab')_2$ comparada con las células que no fueron pre-incubadas con PRL (Figura 13).

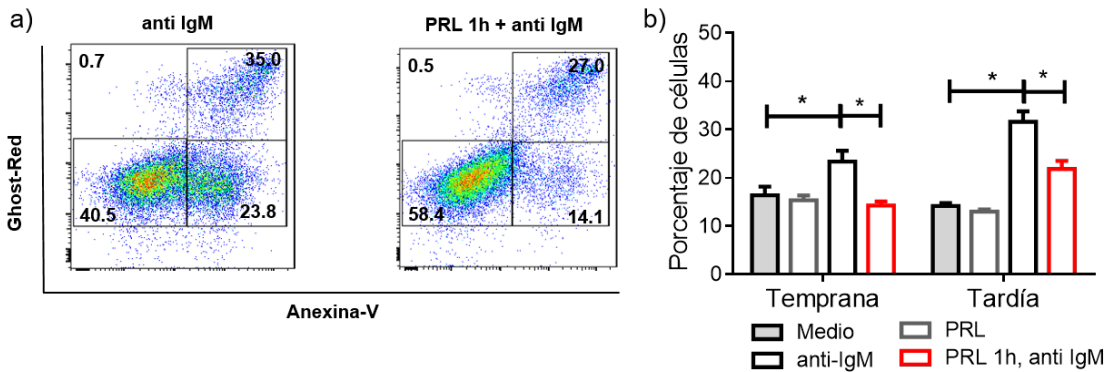


Figura 13. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido a través de la identificación de Anexina V. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ por 48 horas. Las células fueron marcadas con Ghost-Red y Anexina V-FITC para medir la apoptosis temprana (Anexina V⁺ Ghost-Red⁻) y apoptosis tardía (Anexina V⁺ Ghost-Red⁺). a) Dot-Plot representativo del marcaje con Anexina V y Ghost-Red y b) Porcentaje de células en apoptosis. *p<0.01

Por otro lado, el porcentaje de células caspasa-3 activa incrementó significativamente en aquellas que fueron incubadas con anti-IgM F(ab')₂ (50.76 ± 1.35%; p<0.01) comparado con las células incubadas con medio (9.99 ± 0.33%) o PRL (11.0 ± 0.44%). Mientras que el porcentaje de células caspasa-3 activa disminuyó significativamente en las células pre-incubadas con PRL e incubadas con anti-IgM F(ab')₂ (29.50 ± 1.93%; p<0.01) comparado con las células que no fueron pre-incubadas con PRL. Las mismas diferencias fueron encontradas al determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF) [(Medio 197.5 ± 22.4; PRL 185.3 ± 11.68; anti-IgM F(ab')₂ 342.2 ± 35.9; PRL 1 hora y anti-IgM F(ab')₂ 292.3 ± 11.4)] (Figura 14).

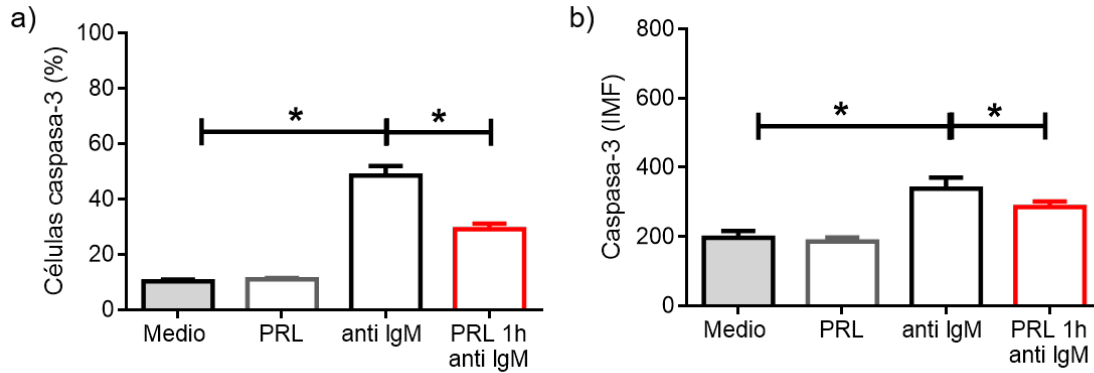


Figura 14. Efecto de la PRL en la apoptosis de células WEHI-231 medido por caspasa-3. Las células WEHI-231 fueron pre-incubadas 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ por 48 horas. Las células fueron marcadas con Ghost-Red y un anticuerpo anti-caspasa-3 activa. a) Porcentaje de células caspasa-3 activa y b) IMF de caspasa-3 activa. *p<0.01

Finalmente, la expresión de genes de apoptosis en células WEHI-231 incubadas con PRL 1 hora se determinó mediante PCR Array. Los resultados mostraron que la PRL modula la expresión de varios genes de la familia de Bcl-2; disminuye la expresión del gen pro-apoptótico Bad (0.22 expresión relativa) e incrementa la expresión de los genes anti-apoptóticos Bag3 (2.50 expresión relativa), Bcl2l1 (2.98 expresión relativa), and Bcl2l2 (3.22 expresión relativa). Además, disminuye la expresión del gen para la caspasa-3 CASP3 (0.29 expresión relativa) y caspasa-9 CASP9 (0.43 expresión relativa) como se muestra en la figura 15a. La expresión de estos genes fue confirmada por PCR tiempo real, encontrando que la PRL incrementa la expresión relativa del gen Bcl-xL (2.07 ± 0.30 expresión relativa) y disminuyó la expresión de Bad (0.47 ± 0.12 expresión relativa) comparado con las células que fueron incubadas con medio ($p < 0.01$). No se observaron cambios en el gen Birc5 (0.95 ± 0.23 expresión relativa) (Figura 15b).

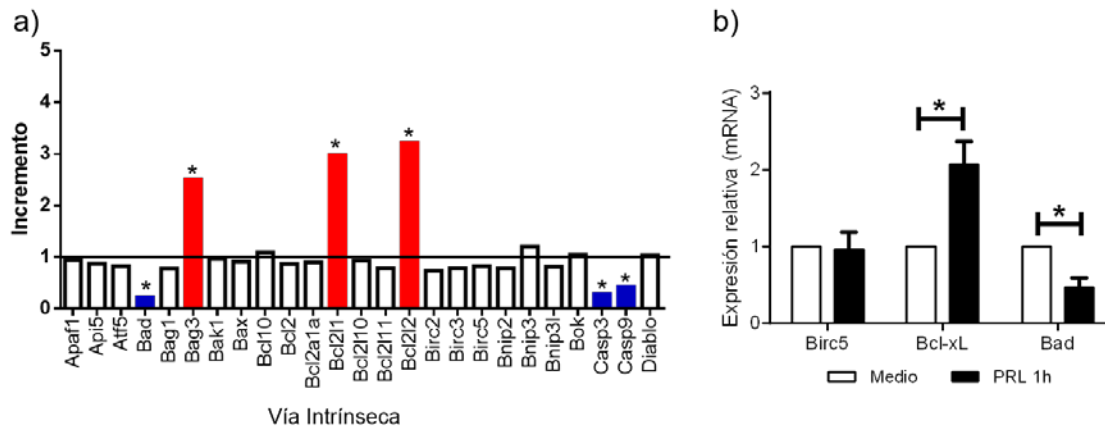


Figura 15. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en células WEHI-231 incubadas 1 hora con PRL. Expresión de genes de apoptosis a) mediante PCR Array y b) mediante PCR tiempo real. * $p < 0.01$

Vías de señalización que activa el receptor de PRL en células WEHI-231

Se determinó cuál o cuáles vías de señalización son inducidas por la interacción de la PRL y su receptor en este modelo. Las células se incubaron con PRL, con inhibidor de PRL (G129R) y con inhibidores de las vías de señalización inducidas por el receptor (PP2, GSK y Stattic). En la figura 16 se muestra la activación de la vía PI3K-AKT medido a través de la fosforilación de la molécula AKT en donde se observa que la PRL promueve la señalización de su receptor a través de esta vía [(Medio 345.3 ± 6.56 ; PRL 400.0 ± 41.8)], lo cual se comprueba con el uso del inhibidor del receptor de PRL (G129R 312.8 ± 32.52) y de inhibidores de la vía [(PP2 286.0 ± 13.65) y (GSK 247.5 ± 50.61)].

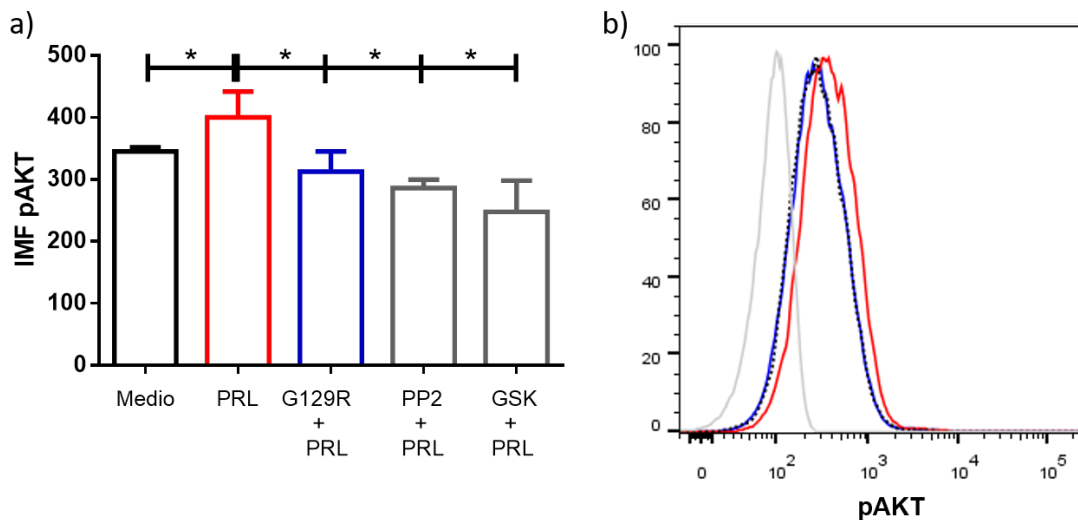


Figura 16. Efecto de la PRL en la activación de la vía PI3K-AKT en células WEHI-231. Se determinó la fosforilación de AKT mediante citometría de flujo en células WEHI-231 incubadas con diferentes inhibidores (G129R, PP2, GSK) y con PRL. Se muestra a) IMF de pAKT y b) Histograma representativo, control de isotipo (gris), medio (negro), PRL (rojo) y G129R (azul). * $p < 0.05$

También se determinó el efecto de la PRL en la activación de la vía de señalización JAK-STAT, midiendo la fosforilación de las tres moléculas STAT que han sido reportadas para el receptor de PRL (STAT-1, STAT-3 y STAT-5). Obteniendo como resultado que la PRL únicamente promueve la fosforilación de STAT-3 [(Medio 155.0 ± 4.58 ; PRL 174.0 ± 2.64)] y cuando las células son incubadas con los diferentes inhibidores se observa una disminución significativa en la fosforilación de STAT-3 [(G129R 153.3 ± 7.23 ; PP2 126.3 ± 3.01 ; Stattic 148.0 ± 8.88)], lo cual se muestra en la figura 17.

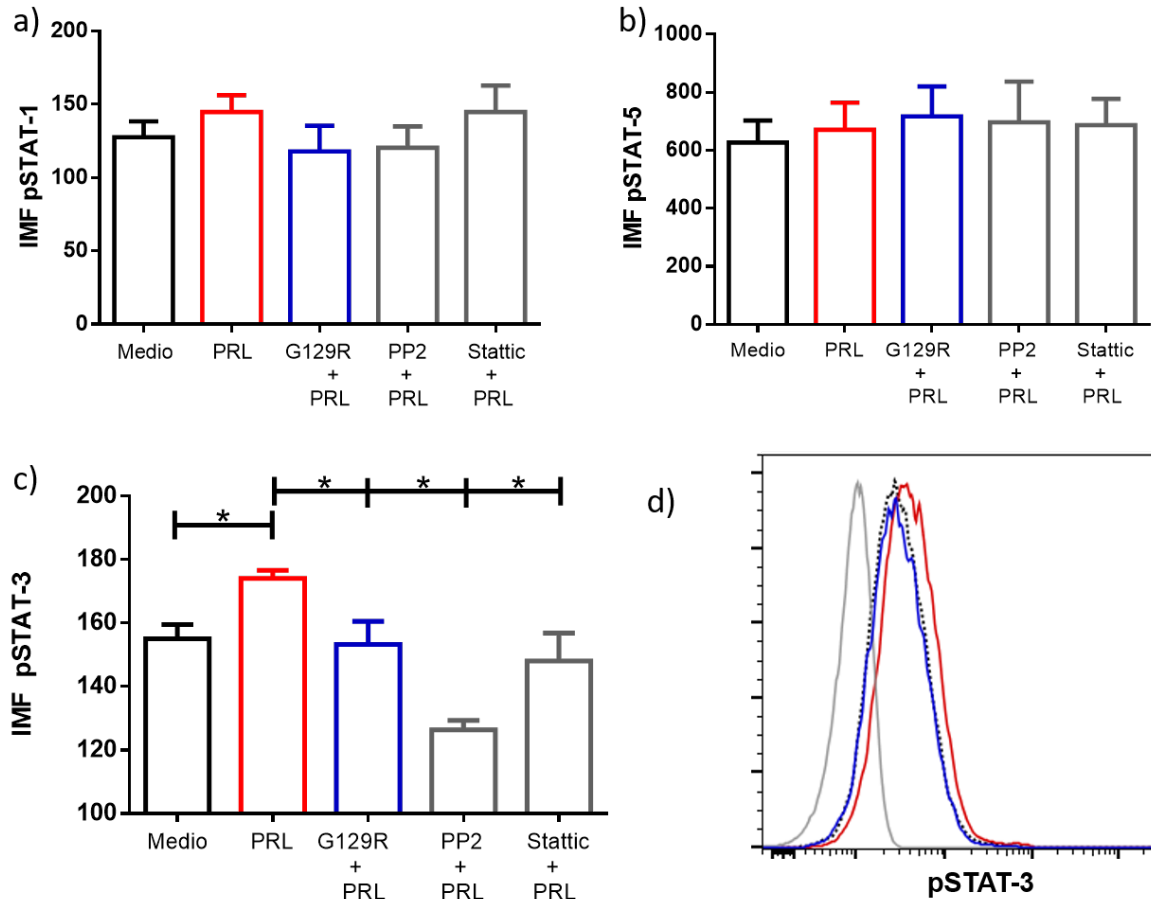


Figura 17. Efecto de la PRL en la activación de la vía de señalización JAK-STAT en células WEHI-231. Se determinó la fosforilación de las moléculas STAT-1, STAT-3 y STAT-5 mediante citometría de flujo en células WEHI-231 incubadas con diferentes inhibidores (G129R, PP2, Stattic) y con PRL. a) IMF de pSTAT-1, b) IMF de pSTAT-5, c) IMF de pSTAT-3 y d) Histograma representativo, control de isotipo (gris), medio (negro), PRL (rojo) y G129R (azul). * $p < 0.05$

Finalmente, para determinar si la interacción PRL-receptor de PRL activa la vía de señalización MAPK, se determinó la fosforilación de ERK. Las células WEHI-231 se incubaron con diferentes inhibidores (G129R, PP2 y GSK). En la figura 18 se muestra la fosforilación de la molécula ERK en donde se observa que la PRL no tiene efecto sobre la fosforilación de esta molécula [(Medio 104.7 ± 5.13 ; PRL 97.80 ± 1.74)], y con los diferentes inhibidores se observa el mismo efecto que solo con PRL [(G129R 96.57 ± 3.36 ; PP2 96.70 ± 2.16 ; GSK 102.7 ± 8.10)].

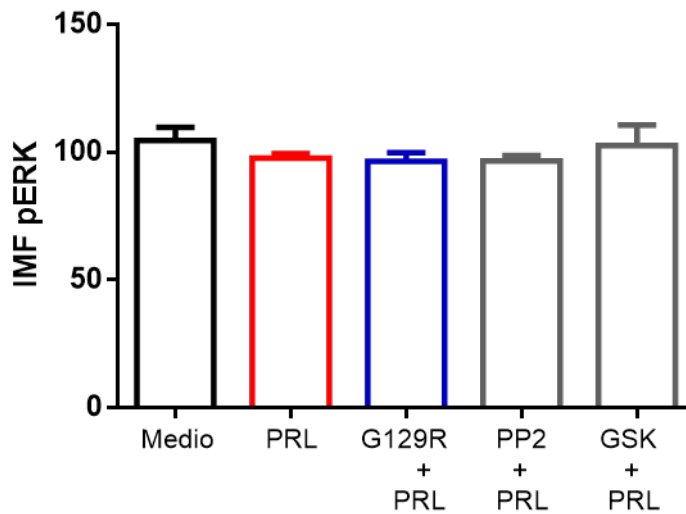


Figura 18. Efecto de la PRL en la fosforilación de ERK en células WEHI-231. Se determinó la fosforilación de ERK mediante citometría de flujo en células WEHI-231 incubadas con diferentes inhibidores (G129R, PP2, GSK) y con PRL.

Unión de STAT-3P a sitios promotores de genes anti-apotóticos en células WEHI-231.

Con base en los resultados obtenidos, en donde se determinó que la PRL a través de la unión a su receptor es capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 y sabiendo que esta molécula funciona como factor de transcripción, se determinó mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) la unión de STAT-3P a los sitios promotores de genes anti-apotóticos. Encontrando que las células WEHI-231 incubadas con PRL inducen la unión de STAT-3P a los promotores de los genes Bcl-xL (3.55 ± 0.35 %Input) y Bcl2l1 (3.15 ± 0.35 %Input) (Figura 19), los cuales por acción de la PRL se encontraron aumentados (Figura 15) y no en los promotores de los genes Bcl1a2a y Bcl2l10 (Figura 19) los cuales no se vieron afectados por la PRL (Figura 15).

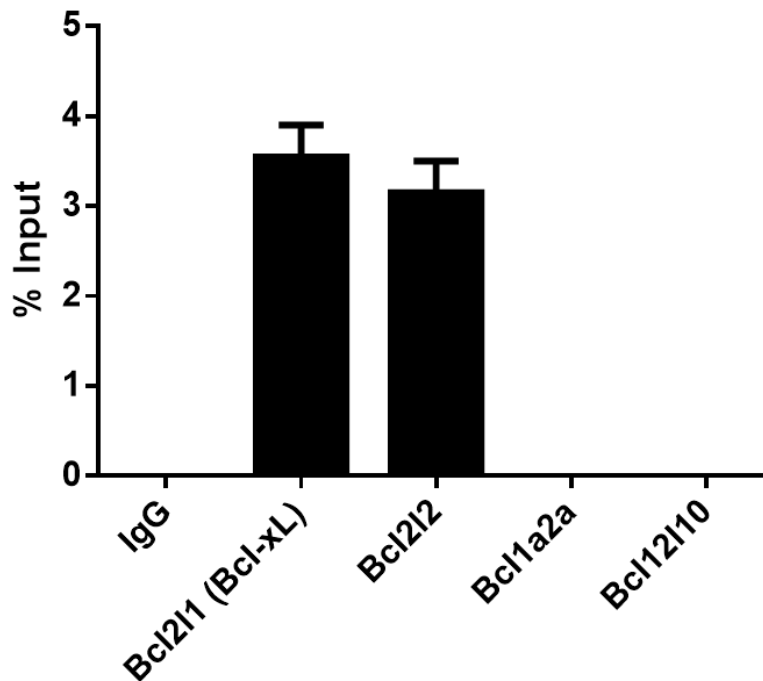


Figura 19. Unión de STAT-3P a sitios promotores de genes anti-apoptóticos. En células WEHI-231 incubadas 1 hora con PRL, se realizó ChIP con anticuerpos anti-IgG y anti STAT-3. Se muestra % de Input en diferentes sitios promotores de genes anti-apoptóticos.

Con los resultados obtenidos determinamos que las células WEHI-231 son rescatadas de la apoptosis cuando son incubadas con PRL, la interacción de esta hormona con su receptor promueve la fosforilación de AKT y STAT-3; y la molécula STAT-3P se une a los sitios promotores de genes anti-apoptóticos promoviendo su expresión. Para comprobar si estas células son rescatadas de la apoptosis a través del receptor de PRL, las células fueron incubadas con los diferentes inhibidores (G129R, GSK, PP2, Stattic) posteriormente con PRL y al final se entrecruzo el BCR. Los resultados se muestran en la figura 20 en donde podemos observar que las células WEHI-231 incubadas con el inhibidor de PRL presentan un menor porcentaje de células vivas y un mayor porcentaje de células en apoptosis en comparación con las células que solo fueron incubadas con la PRL; lo mismo se

obtuvo con los diferentes inhibidores empleados [Porcentaje de células vivas (Medio 73.53 ± 0.20 ; anti-IgM F(ab')₂ 18.87 ± 0.51 ; PRL 1 hora y anti-IgM F(ab')₂ 25.03 ± 0.23 ; G129R 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 20.47 ± 0.83 ; PP2 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 16.33 ± 0.85 ; GSK 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 12.73 ± 0.91 ; Stattic 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 17.37 ± 0.59) y Porcentaje de células caspasa-3 (Medio 31.17 ± 0.25 ; anti-IgM F(ab')₂ 84.40 ± 2.15 ; PRL 1 hora y anti-IgM F(ab')₂ 78.11 ± 0.32 ; G129R 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 83.87 ± 1.52 ; PP2 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 84.4 ± 0.70 ; GSK 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 88.33 ± 0.47 ; Stattic 30min +PRL 1 hora + anti-IgM F(ab')₂ 83.5 ± 0.10)]

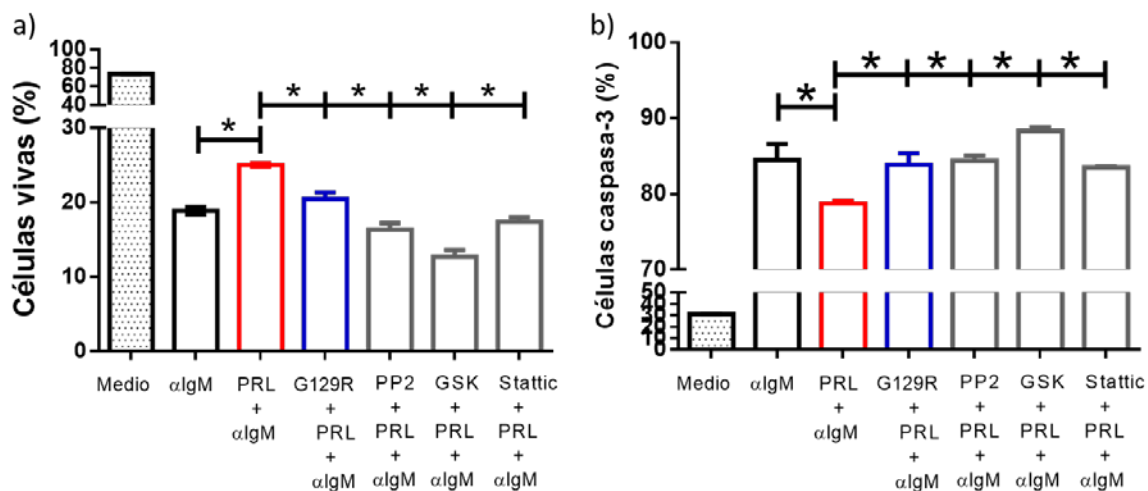


Figura 20. Efecto de la señalización del receptor de PRL en la apoptosis de células WEHI-231. Se determinó el a) porcentaje de células vivas y b) el porcentaje de células caspasa 3 en células WEHI-231 que fueron incubadas con diferentes inhibidores (G129R, PP2, GSK y Stattic), con PRL y además se entrecruzo el BCR para inducir apoptosis (*P<0.05).

Expresión de las isoformas del receptor de PRL en linfocitos B de ratones que desarrollan LES

Se determinó la expresión de las isoformas del receptor de PRL a nivel de mRNA en las poblaciones de linfocitos B de médula ósea provenientes de ratones C57BL/6 (cepa control) y MRL/lpr; a las 9 semanas y con niveles elevados de PRL (15 semanas), encontrando que solo se expresa la isoforma larga. En ratones C57BL/6 de 9 semanas de edad, se encontró que conforme el linfocito B madura, la expresión de la isoforma larga disminuye [pro-B 0.050 ± 0.015 , pre-B 0.044 ± 0.009 e inmaduros 0.010 ± 0.004], el mismo comportamiento se observó en ratones con niveles elevados de PRL [pro-B 0.057 ± 0.008 , pre-B 0.029 ± 0.016 e inmaduros 0.010 ± 0.003] (figura 21a). Por otro lado, en ratones que desarrollan LEG (MRL/lpr) se encontró que la población de linfocitos pro-B (0.012 ± 0.003) tiene mayor expresión de la isoforma larga, la cual disminuye en pre-B (0.004 ± 0.004) pero incrementa en los linfocitos B inmaduros (0.011 ± 0.004); esta expresión fue menor que la encontrando en ratones C57BL/6. Mientras que en ratones MRL/lpr con niveles elevados de PRL se encontró un aumento en la expresión de la isoforma larga en todas las poblaciones, siendo mayor en linfocitos B inmaduros [pro-B 0.067 ± 0.007 , pre-B 0.061 ± 0.007 e inmaduros 0.130 ± 0.024] (figura 21b).

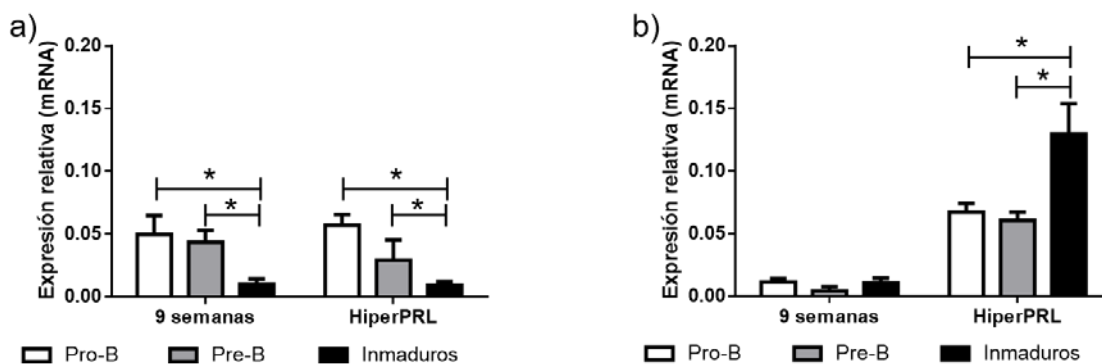


Figura 21. Expresión Relativa de la isoforma larga del receptor de PRL. A partir de linfocitos pro-B, pre-B e inmaduros purificados por citometría de flujo se realizó RT-PCR tiempo real para determinar las isoformas del receptor de PRL a) linfocitos provenientes de ratones C57BL/6 de 9 semanas y con niveles elevados de PRL (15 semanas) y b) linfocitos provenientes de ratones MRL/lpr de 9 semanas y con niveles elevados de PRL (15 semanas).

Efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis de linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES.

Para medir el efecto de la PRL en la viabilidad y apoptosis de linfocitos B inmaduros, se realizó la purificación de linfocitos B inmaduros de ratones C57BL/6 y MRL/lpr (desarrollan LES) mediante citometría de flujo, se realizó el marcaje de viabilidad con Ghost-Red y para determinar apoptosis se realizó el marcaje con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa. En ratones control C57BL/6 se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en el porcentaje de células vivas cuando los linfocitos B inmaduros fueron incubados con anti-IgM F(ab')₂ ($43.68 \pm 3.01\%$) comparado con las células incubadas con medio ($53.42 \pm 1.75\%$) o PRL ($53.40 \pm 1.14\%$). No se encontró diferencia en las células vivas en los linfocitos B inmaduros pre-incubados con PRL e incubados con anti-IgM F(ab')₂ ($43.22 \pm 2.79\%$) en comparación con los linfocitos que no fueron incubados con la hormona (Figure 22a). Resultados similares fueron encontrados al determinar apoptosis. El porcentaje de células caspasa-3 activa incrementó significativamente ($32.40 \pm 0.94\%$; $p < 0.01$) en los linfocitos B inmaduros incubados con anti-IgM F(ab')₂ comparado con los linfocitos incubados con medio (26.43 ± 0.87) o PRL ($26.47 \pm 0.70\%$). No hubo diferencia ($p = 0.2497$) en el porcentaje de células caspasa-3 activa en linfocitos B inmaduros pre-incubados con PRL e incubados con anti-IgM F(ab')₂ ($30.98 \pm 2.61\%$) comparado con los linfocitos que no fueron pre-incubados PRL (Figure 23a).

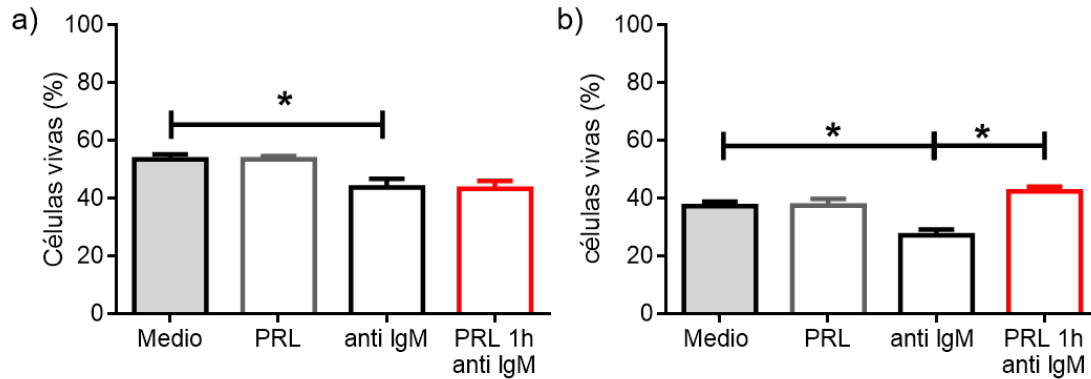


Figura 22. Efecto de la PRL en la viabilidad de linfocitos B inmaduros. Linfocitos B inmaduros purificados mediante citometría de flujo fueron pre-incubados 1 hora con PRL e incubados con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ por 18 horas. Las células muertas fueron marcadas con G host-Red. a) Porcentaje de células vivas C57BL/6 y b) Porcentaje de células vivas MRL/lpr *p<0.01.

Mientras que en linfocitos B inmaduros de ratones MRL/lpr al ser incubados con anti-IgM F(ab')₂ 18 horas, el porcentaje de células vivas disminuyó significativamente ($25.40 \pm 1.27\%$; $p < 0.01$) al compararlo con linfocitos incubados con medio ($37.96 \pm 0.50\%$) PRL ($37.30 \pm 2.43\%$). Mientras que los linfocitos pre-incubados con PRL e incubados con anti-IgM F(ab')₂ incrementaron significativamente el porcentaje de células vivas ($41.10 \pm 2.26\%$) comparado con los linfocitos que no fueron pre-incubados con la hormona ($p < 0.01$) (Figure 22b). Por otro lado, al determinar el porcentaje de células caspasa-3 activa, los linfocitos B inmaduros que fueron incubados con anti-IgM F(ab')₂ incrementaron el porcentaje de células caspasa-3 activa ($49.65 \pm 0.64\%$; $p < 0.01$) comparado con los linfocitos incubados con medio ($37.80 \pm 0.57\%$) o PRL ($30.98 \pm 7.39\%$). Mientras que el porcentaje de células caspasa-3 activa disminuyó significativamente en los linfocitos pre-incubados con PRL e incubados con anti-IgM F(ab')₂ (34.75 ± 1.91) comparado con los linfocitos que no fueron pre-incubados con PRL (Figure 23b).

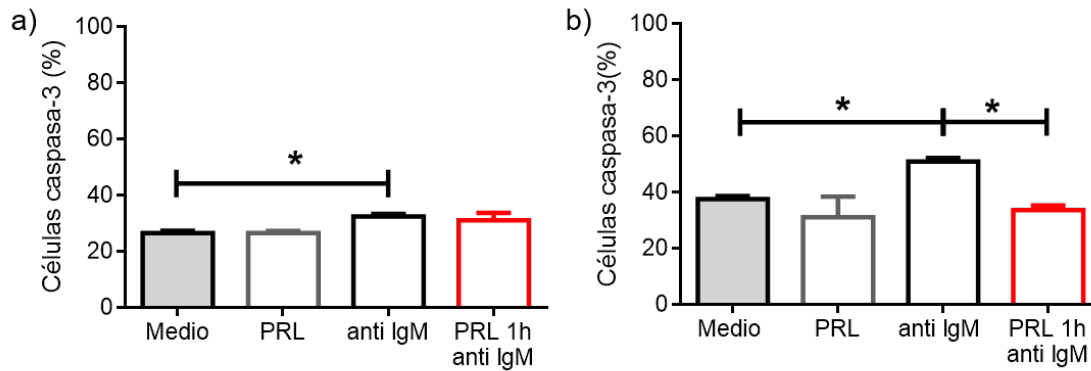


Figura 23. Efecto de la PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros. Linfocitos B inmaduros purificados mediante citometría de flujo fueron pre-incubados 1 hora con PRL e incubadas con un anticuerpo anti-IgM F(ab')₂ por 18 horas. Las células fueron marcadas con Ghost-Red y un anticuerpo anti-caspasa-3 activa C57BL/6 y b) Porcentaje de células caspasa-3 activa MRL/lpr. *p<0.01

Se determinó la expresión de genes de apoptosis en linfocitos B inmaduros de ratones C57BL/6 y ratones MRL/lpr incubados con PRL 1 hora mediante PCR Array. Los resultados mostraron que la PRL en ratones C57BL/6 modula la expresión de varios genes; aumenta y disminuye la expresión relativa tanto de genes pro-apoptóticos [Apaf-1 (2.32), Bcl-10 (4.44), Bnip3l (6.28)] como genes anti-apoptóticos [Api-5 (2.18), Birc5 (3.10), Bnip2 (2.55), Bcl2a1a (0.22), Bcl2l2 (0.14), Birc2 (0.28)], así como genes que tienen la doble función [Bcl-2 (3.82), Bcl2l1 (7.74), Bcl2l11 (3.41), Bnip3 (6.28)] (figura 24 a). Mientras que en ratones MRL/lpr la PRL únicamente incrementa la expresión relativa de genes; principalmente genes anti-apoptóticos [Api5 (2.96), Bag3 (3.74), Bcl2a1a (9.88), Bcl2l2 (8.30), Birc5 (10.59)], dos genes pro-apoptóticos [Apaf1 (2.33) y Bok (2.66)], y dos genes con función doble [Bcl2l10 (2.22) y Bnip3 (2.05)] (figura 24b). Cuando los linfocitos B inmaduros fueron incubados con G129R se observó una regulación negativa en la expresión relativa de genes anti-apoptóticos que fueron incrementados en presencia de PRL [Api5 (0.0003), Bag (0.16), Bcl2a1a (0.52), Bcl2l10 (0.008), Bcl2l2 (0.99) y Birc5 (0.80)], además de disminuir la expresión relativa de otros genes [Apaf1(0.03), Bag1 (0.13), Bak1 (0.14), Bcl2l1 (0.36), Bcl2l11 (0.49), Birc2 (0.20), Birc3 (0.33) y Casp3 (0.24)] (figura 24 c), lo cual fue muy similar a lo observando con Stattic inhibidor de Stat3 (figura 24d).

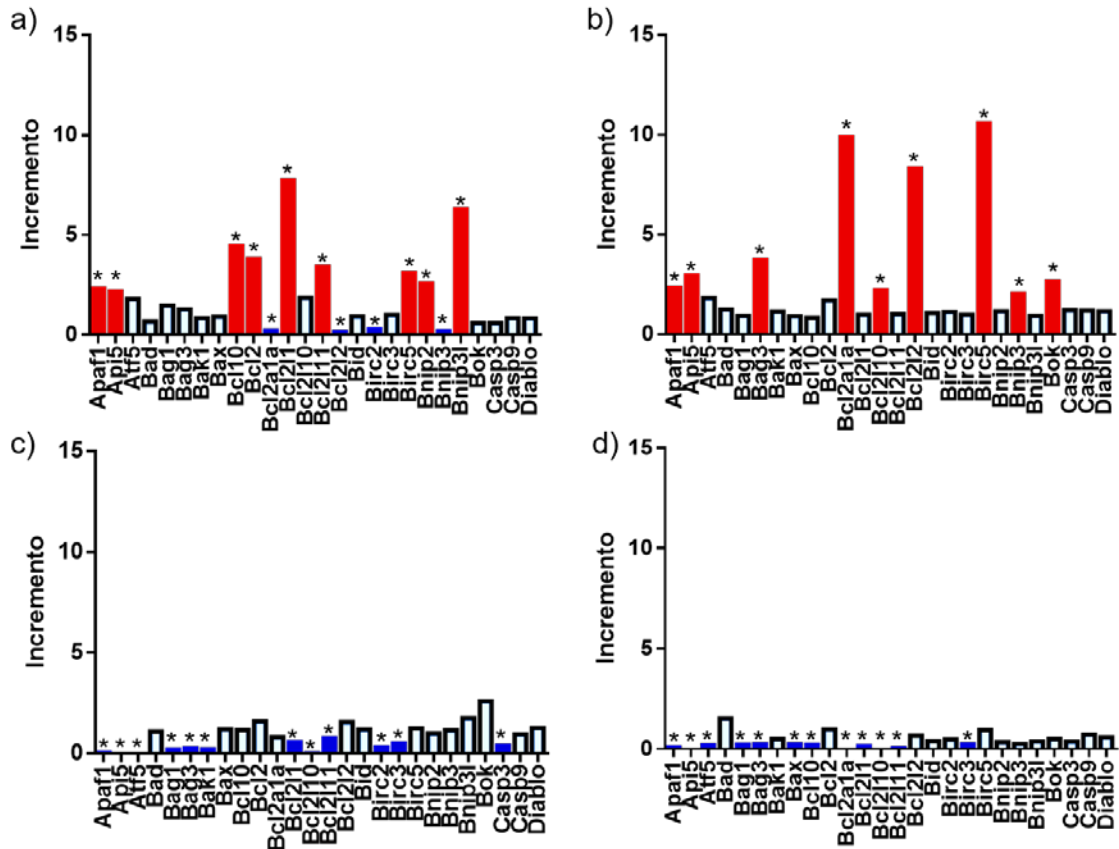


Figura 24. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en linfocitos B inmaduros. Se determinó la expresión de genes de apoptosis mediante PCR Array en linfocitos B inmaduros de médula ósea incubados con PRL 1 hora a) C57BL/6, b) MRL/lpr, c) MRL/lpr incubados previamente con G129R durante 30 minutos y d) MRL/lpr incubados previamente con Stattic durante 30 minutos. *p<0.01

La expresión de algunos genes fue confirmada por PCR tiempo real, encontrando que la PRL incrementó la expresión relativa de los genes Birc5 y Bcl-xL en ratones C57BL/6, la PRL incremento a la expresión de Birc5 y en presencia de G129, esta expresión se ve disminuida (Figura 25).

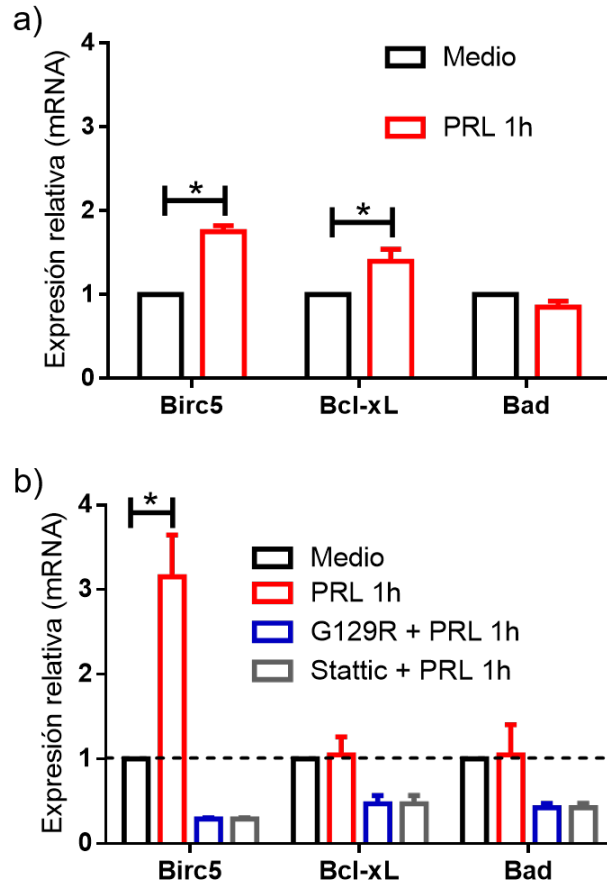


Figura 25. Expresión de genes apoptóticos modulados por PRL en linfocitos B inmaduros. Se confirmó la expresión de algunos genes de apoptosis mediante PCR tiempo real en linfocitos B inmaduros de médula ósea incubados con PRL 1 hora a) C57BL/6, b) MRL/lpr. * $p < 0.01$

Vía de señalización que activa el receptor de PRL en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones que desarrollan LES

En la figura 26 se muestra el efecto de la PRL y su receptor en la señalización de la vía PI3K-AKT medido a través de la fosforilación de AKT, en donde se observa que en ratones control C57BL/6 y en ratones MRL/lpr que desarrollan LES, la PRL no tiene efecto en la fosforilación de AKT.

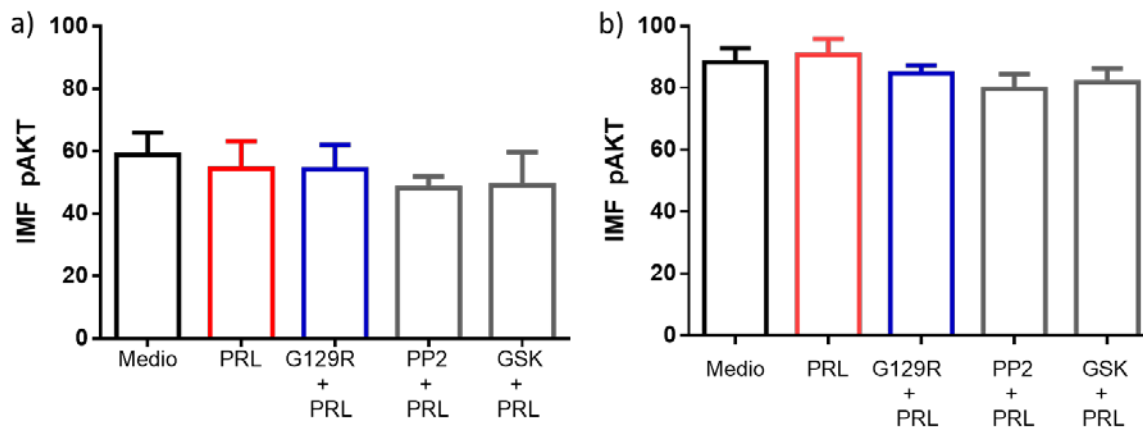


Figura 26. Efecto de la PRL la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en linfocitos B inmaduros. Se determinó la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones control y que desarrollan LES incubados con diferentes inhibidores de esta vía (PP2 y GSK), G129R y con PRL; posteriormente se determinó la fosforilación de AKT por citometría de flujo. En ratones a) C57BL/6 y b) MRL/lpr

Posteriormente se determinó el efecto de la PRL y su receptor en la activación de la vía de señalización JAK-STAT medido a través de la fosforilación de las moléculas STAT-1, STAT-3 y STAT-5. Para la activación de STAT-1 y STAT-5 no se observaron diferencias entre los ratones C57BL/6 y los ratones que desarrollan LES (figura 27).

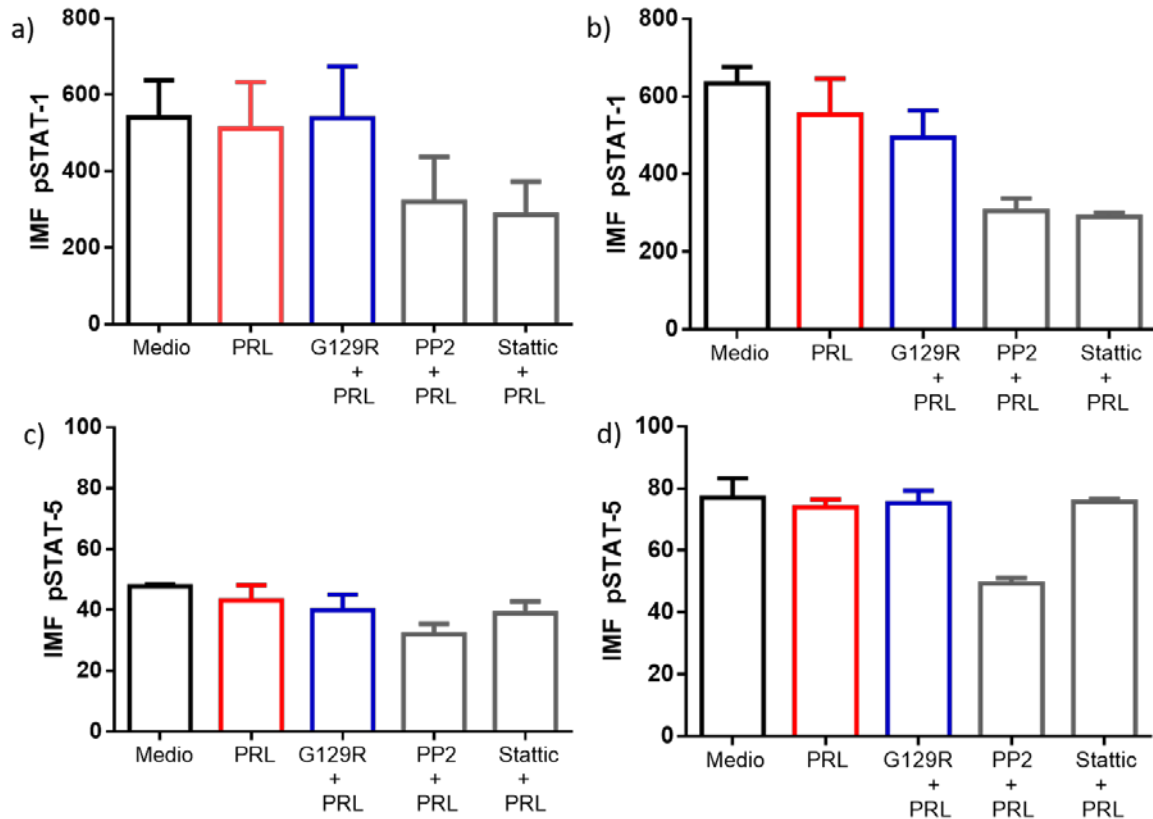


Figura 27. Efecto de la PRL en la fosforilación de STAT-1 y STAT-5 en linfocitos B inmaduros. Se determinó la fosforilación de STAT-1 y STAT-5 mediante citometría de flujo en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones control y que desarrollan LES incubados con diferentes inhibidores (G129R, PP2 y Stattic) y con PRL. a) STAT-1 en C57BL/6, b) STAT-1 en MRL/lpr, c) STAT-5 en C57BL/6 y d) STAT-5 en MRL/lpr.

Cuando se determinó la activación de STAT-3 observamos que en ratones control C57BL/6 no hay efecto de la PRL; mientras que en los ratones que desarrollan LES la PRL a través de su receptor induce la fosforilación de la molécula STAT-3 y está disminuye en presencia del inhibidor del receptor de PRL [(Medio 23.3 ± 3.25 ; PRL 33.35 ± 0.21 ; G129R 27.05 ± 1.06 ; PP2 28.50 ± 0.99 ; Stattic 24.47 ± 3.75] (figura 28).

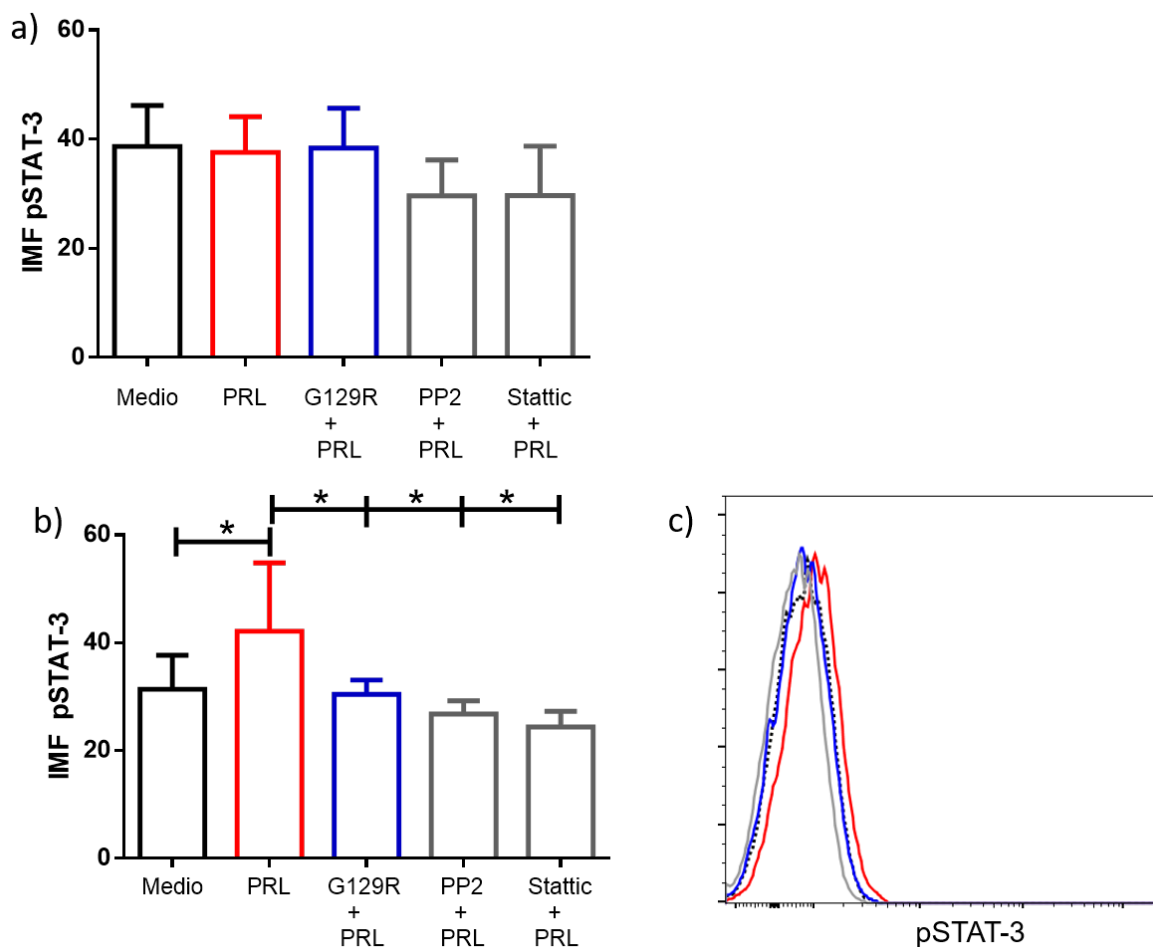


Figura 28. Efecto de la PRL la activación de STAT-3 en linfocitos B inmaduros. Se determinó la activación de la vía de señalización JAK-STAT en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones control y que desarrollan LES incubados con diferentes inhibidores (G129R, PP2, Stattic) y con PRL. Posteriormente se determinó la fosforilación de STAT-3 por citometría de flujo. Se muestra a) C57BL/6 y b) MRL/lpr.

Finalmente se determinó la fosforilación de ERK molécula importante en la vía de señalización de MAPK, mostrando que en ambas cepas de ratones la PRL no tiene efecto en la fosforilación de esta molécula, siendo evidente la intensidad media de fluorescencia de pERK es mayor en ratones que desarrollan LES [C57BL/6 (Medio 39.10 ± 5.28 ; PRL 37.50 ± 6.96 ; G129R 39.17 ± 6.20 ; PP2 38.03 ± 6.18) y MRL/lpr (Medio 81.90 ± 1.00 ; PRL 80.25 ± 0.07 ; G129R 82.30 ± 3.30 ; PP2 79.97 ± 6.10)] (figura 29).

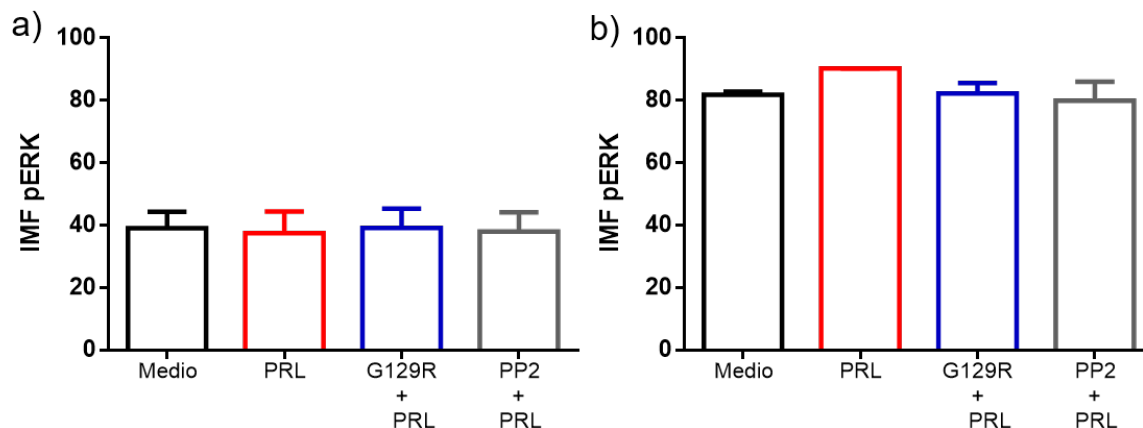


Figura 29. Efecto de la PRL la activación de ERK en linfocitos B inmaduros. Se determinó la activación de la vía de señalización MAPK en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones control y que desarrollan LES incubados con diferentes inhibidores (G129G, P P2) y con PRL; posteriormente se determinó la fosforilación de ERK por citometría de flujo. Se muestra a) C57BL/6 y b) MRL/lpr.

Unión de Stat-3P a sitios promotores de genes anti-apotóticos en linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES.

Se determinó mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) la unión de Stat-3P a los sitios promotores de genes anti-apotóticos. Encontrando que en linfocitos B inmaduros incubados con PRL se induce la unión de Stat-3P a los promotores de los genes Bcl-xL (2.65 ± 0.21 %Input) y Birc5 (3.10 ± 0.28 %Input) en ratones C57BL/6, mientras que en ratones MRL/lpr Stat-3P se unió a los sitios promotores de los genes Bcl2l2 (3.90 ± 0.28 %Input), Bcl1a2a (6.05 ± 0.35 %Input), Bcl2l10 (3.90 ± 0.14 %Input) y Birc5 (6.20 ± 0.42 %Input) (Figura 30).

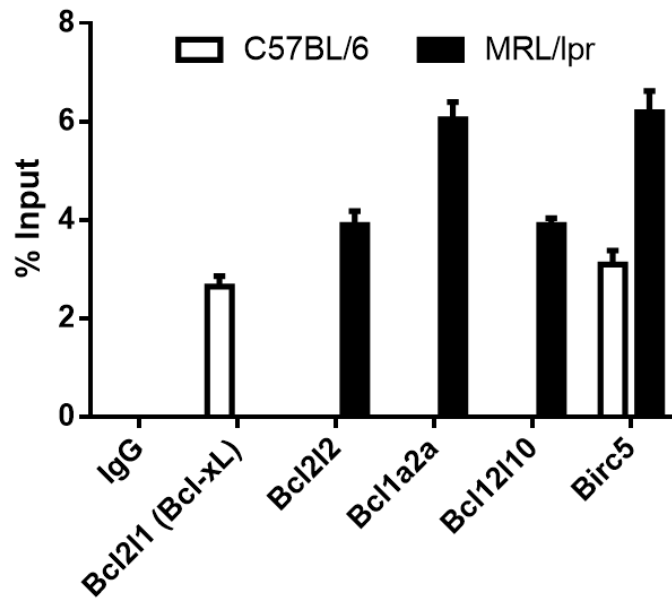


Figura 30. Unión de Stat-3P a sitios promotores de genes anti-apoptóticos en linfocitos B inmaduros. En linfocitos B inmaduros incubados 1 hora con PRL, se realizó ChIP con anticuerpos anti-IgG y anti Stat-3. Se muestra % de Input en diferentes sitios promotores de genes anti-apoptóticos.

Para comprobar que la unión de la prolactina con su receptor es responsable de rescatar a los linfocitos B inmaduros de la apoptosis, realizamos los ensayos de apoptosis usando el inhibidor del receptor de PRL así como Stattic inhibidor de STAT-3 ya que se observó que la PRL activa la vía de JAK-STAT-3, los resultados mostraron que solo en ratones que desarrollan LES, la PRL rescata a las células de la apoptosis inducida por anticuerpos anti IgM y cuando se usó el inhibidor del receptor el efecto de la PRL fue revertido. [MRL/lpr (Medio 42.85 ± 2.20 ; PRL 18.00 ± 1.27 ; G129R 32.95 ± 3.18 ; Stattic 31.35 ± 4.03)]. Mientras que en ratones control no hay efecto de la PRL y con el inhibidor se mantiene el mismo comportamiento, solo con Stattic se observó un incremento en las tasas de apoptosis de estas células. [C57BL/6 (Medio 16.40 ± 1.70 ; PRL 16.05 ± 4.17 ; G129R 18.95 ± 1.63 ; Stattic 25.59 ± 2.62) (figura 31).

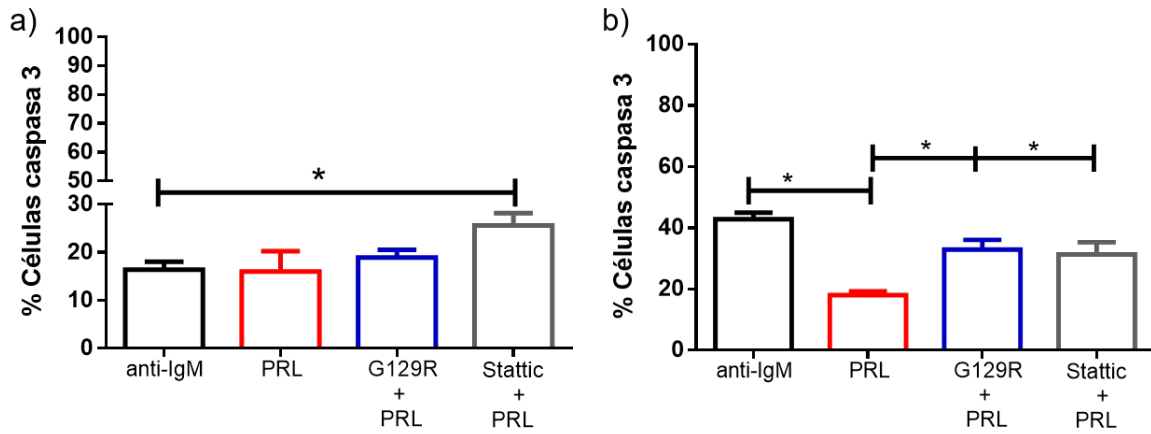


Figura 31. Efecto de la señalización del receptor de PRL en la apoptosis de linfocitos B inmaduros. Se determinó el porcentaje de células caspasa 3 en linfocitos B inmaduros que fueron incubadas con G129R, Stattic; y con PRL, y posteriormente se entrecruzo el BCR para inducir apoptosis. a) C57BL/6 y b) MRL/lpr (*p<0.05).

Discusión

Se conoce que la PRL tiene un papel en los mecanismos de tolerancia periférica del linfocito B, en donde se ha demostrado que modula genes anti-apoptóticos y moléculas como CD40 y BAFFR (95). Sin embargo, no se cuenta con información sobre el efecto de la PRL en la tolerancia central. Por otro lado, se sabe que en ratones que desarrollan LES hay una disminución de linfocitos B inmaduros y un incremento de linfocitos B T1 (91,97); y se sabe que en el estadio de linfocito B inmaduro se lleva la eliminación de la mayor parte de linfocitos B autorreactivos (24). La falla en la eliminación de las clonas autorreactivas favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes como LES. Por lo que decidimos determinar el efecto que tiene la PRL en la supervivencia de linfocitos B inmaduros; para lo cual empleamos dos modelos. El primer modelo fue la línea celular WEHI-231 que presenta un fenotipo de linfocito B inmaduro y tiene la característica que al entrecruzar su BCR estas células son eliminadas por apoptosis lo cual mimetiza la interacción del BCR con antígenos propios (98); y el segundo modelo linfocitos B inmaduros provenientes de ratones que desarrollan LES.

En trabajos previos en nuestro grupo se ha demostrado que todos los estadios de maduración del linfocito B en médula ósea y bazo expresan el receptor de PRL en cepas de ratones que desarrollan LES (91,97), sin embargo, no se ha establecido si predomina la expresión de alguna de las isoformas del receptor. En estudios realizados en humanos se ha reportado que la isoforma larga está asociada con la progresión y metástasis en cáncer de mama, promoviendo la proliferación y supervivencia de las células cancerosas; mientras que la isoforma corta ha sido asociada con efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos (99-101). Por lo que en este trabajo se determinó la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL a nivel de mRNA. Nuestros resultados muestran que en el modelo de células WEHI-231 se expresa únicamente la isoforma larga del receptor. El mismo resultado se observó en linfocitos B de médula ósea de ratones control y ratones que desarrollan LES, donde la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL fue

mayor en ratones que desarrollan LES con niveles elevados de PRL. Con esto se demostró que en linfocitos B inmaduros solo se expresa la isoforma larga y esto nos indica que la unión de la PRL podría estar favoreciendo la supervivencia o la proliferación de estas células.

El estadio de linfocito B inmaduro es un punto importante para la eliminación de las clonas autorreactivas, aproximadamente el 70% de estas células son eliminadas (22). Uno de los mecanismos por el que se da la eliminación de las clonas autorreactivas, es la muerte por apoptosis (27); y como se sabe que la PRL tiene efectos anti-apoptóticos en diversos tipos celulares (102-104), decidimos estudiar el efecto que tiene esta hormona en la apoptosis de los linfocitos B inmaduros.

En nuestro modelo con la línea celular WEHI-231, determinamos que las células incubadas con PRL y en las cuales posteriormente se entrecruza su BCR, incrementaron su supervivencia y mostraron una disminución en la apoptosis al compararlo con las células que no fueron incubadas con PRL. Con estos resultados demostramos que la PRL rescata a las células WEHI-231 de la apoptosis. Para conocer cómo es que la PRL está rescatando de la apoptosis a las células WEHI-231, determinamos por PCR Array la expresión de genes de apoptosis. Nuestros resultados mostraron que la PRL modula la expresión de genes de la familia Bcl-2; aumentando la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl2l1 (Bcl-xL) y Bcl2l2; y disminuyendo la expresión del gen pro-apoptótico Bad. Nuestros datos muestran por vez primera el efecto de la PRL en las células WEH-231 y tienen concordancia con lo descrito en otro tipo de línea celular, como las células Nb2 (linfocitos pre-T de rata), en donde se demostró que la PRL incrementa la supervivencia de estas células incrementando la expresión de Bcl-xL (105). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en las células Nb2, donde no observó efecto de la PRL en la expresión del gen pro-apoptótico Bad, nuestros resultados mostraron una disminución en este gen. Se sabe que Bad se puede unir a Bcl-2 o Bcl-xL, promoviendo apoptosis (106), la disminución en la expresión de este gen en las células WEHI-231, concuerda con un menor porcentaje de células en apoptosis.

Los efectos que ejerce la PRL son mediados a través de la unión a su receptor, nuestros resultados mostraron que las células WEHI-231 solo expresan la isoforma larga del receptor de PRL, y se sabe que esta isoforma es capaz de activar las vías de señalización JAK-STAT, PI3K-AKT y MAPK (53). Para determinar la señalización que induce la unión de la PRL a su receptor en células WEHI-231, realizamos ensayos de fosforilación de proteínas de las diferentes vías de señalización. Nuestros resultados mostraron que la interacción PRL-receptor de PRL en células WEHI-231, es capaz de activar las vías de señalización PI3K-AKT y JAK-STAT, esta última a través de la fosforilación de STAT-3. En estudios previos se ha reportado que la PRL es capaz de inducir la activación de la vía de señalización PI3K-AKT, lo cual se ha asociado con rescatar células Nb2 de la apoptosis (107). Además, se sabe que la vía de señalización PI3K-AKT incrementa la expresión de moléculas anti-apoptóticas en diversos tipos de células como linfocitos B, linfocitos T y neutrófilos, tanto en estado patológico como en homeostasis (108-110). Estos datos concuerdan con los resultados encontrados en donde la PRL rescata a las células WEHI-231 de la apoptosis a través de las vías de señalización PI3K-AKT.

En linfocitos B inmaduros provenientes de ratones que desarrollan LES, la PRL también aumentó la supervivencia y disminuyó la apoptosis de estas células. Este efecto no se observó en ratones control. Determinamos la expresión de genes relacionados con apoptosis y demostramos que en linfocitos B inmaduros provenientes de ratones control, la PRL modula tanto a la alta como a la baja la expresión de genes anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, principalmente de la familia Bcl-2, este balance entre genes pro y anti apoptóticos concuerda con que la PRL no fue capaz de salvar a estas células de la apoptosis. A diferencia de lo encontrado en linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES, donde la PRL incrementó la expresión de genes anti-apoptóticos principalmente de la familia Bcl-2, además del gen Birc5. Se sabe que linfocitos B de bazo al ser tratados con PRL son más resistentes a la apoptosis en ratones B6.Sle.3 (111). Algunos genes de la familia Bcl-2 participan en la supervivencia de linfocitos B tanto en médula ósea como en

periferia, se demostró que Bcl-xL es importante para la supervivencia de linfocitos B inmaduros mientras que Bcl-2 es importante en linfocitos B maduros (112,113), lo cual concuerda con nuestros resultados. Otros miembros de la familia de Bcl-2 que se han asociado con la supervivencia de linfocitos B inmaduros son BCL-W, BCL2A1A, este último también se encontró aumentando en las células de ratones que desarrollan LES tratadas con PRL (114,115). Además, se ha demostrado que Birc5 es importante para la supervivencia de linfocitos B inmaduros y linfocitos B maduros (116), y se reportó la expresión a nivel de mRNA en linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES y esta expresión se incrementó en ratones con niveles elevados de PRL (97), lo cual concuerda con los resultados mostrados. Además, en pacientes con enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple se ha descrito que la PRL aumenta la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y disminuye la expresión de genes pro-apoptóticos como Trp63 (117). Mientras que la molécula anti-apoptótica Birc5 se expresa en células mononucleares de pacientes con Miastenia Gravis en comparación con sujetos sanos que no la expresan (118) y además el aumento de Birc5 se ha asociado a un mal pronóstico en Artritis Reumatoide (119,120). Por lo que nuestros resultados indican que esta hormona rescata de la apoptosis inducida a través del BCR a los linfocitos B inmaduros únicamente en ratones que desarrollan LES.

A diferencia de lo observado en la línea celular, en los linfocitos B inmaduros provenientes de ratones, no observamos activación de la vía de señalización MAPK, ya que la PRL no fue capaz de aumentar la fosforilación de ERK. Sin embargo, si demostramos que la fosforilación de ERK es mayor en los linfocitos provenientes de ratones que desarrollan LES en comparación con los ratones control. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado, en donde se ha observado que la fosforilación de ERK está aumentada únicamente en pacientes con LES (121,122). Tampoco demostramos activación de la vía PI3K-AKT a diferencia de lo observado en la línea celular WEHI-231. Estos datos demuestran que el efecto de la unión de la PRL al su receptor dependerá del tipo de célula que se está estudiando. La única vía de señalización que se activó en los linfocitos B inmaduros

de ratones que desarrollan LES por efecto de la unión de la PRL a su receptor, fue la vía JAK-STAT3. Se sabe que la señalización a través de JAK-STAT es capaz de modular la expresión de genes apoptóticos de la familia Bcl-2, por ejemplo, en células T activadas y neutrófilos, la señalización vía JAK-STAT induce la expresión de moléculas de la familia Bcl-2 (109,110). En particular la activación de STAT-3 en linfocitos T ayuda mantener la homeostasis regulando la expresión de genes de la familia Bcl-2 (123), y en líneas celulares de cáncer, incrementa la expresión de genes anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, además de Birc5 y Mcl-1 (124 - 126). Lo cual apoya los resultados mostrados en los ratones que desarrollan LES, en donde la PRL promueve la fosforilación de STAT-3 y está su vez estaría modulando la expresión de genes anti-apoptóticos para rescatar a las células de la apoptosis.

Para demostrar que la activación de STAT-3 observada tanto en células WEHI-231 como en los linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES, induce la expresión de los genes anti-apoptóticos, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Demostramos que STAT-3 activado se une a los sitios promotores de los genes que fueron modulados por la PRL en ambos modelos. En linfocitos B inmaduros provenientes de ratones que desarrollan LES, estos resultados tienen un impacto en el desarrollo y manifestaciones de la enfermedad como se describió en un trabajo previo (91).

Finalmente, para comprobar que estos efectos se deban al receptor de PRL se utilizó un inhibidor del receptor, el cual es una molécula similar a la PRL excepto porque presenta una mutación que tiene como consecuencia un cambio de aminoácido en la posición 129, de una Glicina a una Arginina (G129R), este cambio permite que el inhibidor se una a un receptor, pero no al segundo por lo que no dimeriza y esto inhibe la señalización. Ya se ha descrito que este inhibidor es capaz de inhibir la fosforilación de STAT-3 en células de cáncer de mama, además de regular la expresión de genes de la familia Bcl-2 modulados por la PRL (127,128). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que al utilizar el inhibidor del receptor de PRL (G129R), observamos que la PRL no es capaz de rescatar a las células de

la apoptosis, encontrando que se disminuye la expresión de los genes anti-apoptóticos que fueron incrementados, y además inhibe la activación de las vías de señalización que son activadas por esta hormona. Con estos resultados mostramos que los efectos observados en las células incubadas con PRL son específicos de la señalización a través de su receptor.

Con nuestros resultados describimos el mecanismo de acción de la PRL tanto en la línea celular WEHI-231 como en los linfocitos B inmaduros provenientes de ratones que desarrollan LES. Demostramos que la PRL ejerce sus efectos a través de la unión con la isoforma larga de su receptor, esta interacción promueve la activación de la vía JAK-STAT3, la fosforilación y dimerización de STAT-3, promueve que funcione como factor de transcripción y se una a los sitios promotores de los genes anti-apoptóticos, incrementando la expresión de estos genes, lo que tiene como consecuencia promover la supervivencia y el rescate de la apoptosis de los linfocitos B inmaduros. Mientras que cuando se usa el inhibidor del receptor de PRL, los efectos observados por acción de esta hormona se ven revertidos. (Figura 26). En los ratones que desarrollan LES, estos resultados muestran que la PRL estaría rescatando de la apoptosis a las clonas de células B inmaduras que están reconociendo antígenos propios en médula ósea (clonas autorreactivas), lo que se traduciría en la maduración de clonas de células B autorreactivas incrementando el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes.

Conclusiones

La PRL rescata a linfocitos B inmaduros de la apoptosis inducida por BCR, a través de la isoforma larga del receptor de PRL, induciendo las vías de señalización PI3K-AKT (solo en las células WEHI-231) y JAK-STAT-3. Esto promueve la transcripción de genes anti-apoptóticos principalmente de la familia Bcl-2, así como de Birc5; a través de la unión de Stat-3P a los sitios promotores de los genes anti-apoptóticos. Finalmente, al usar el inhibidor específico del receptor de PRL se demostró que los efectos de esta hormona son revertidos.

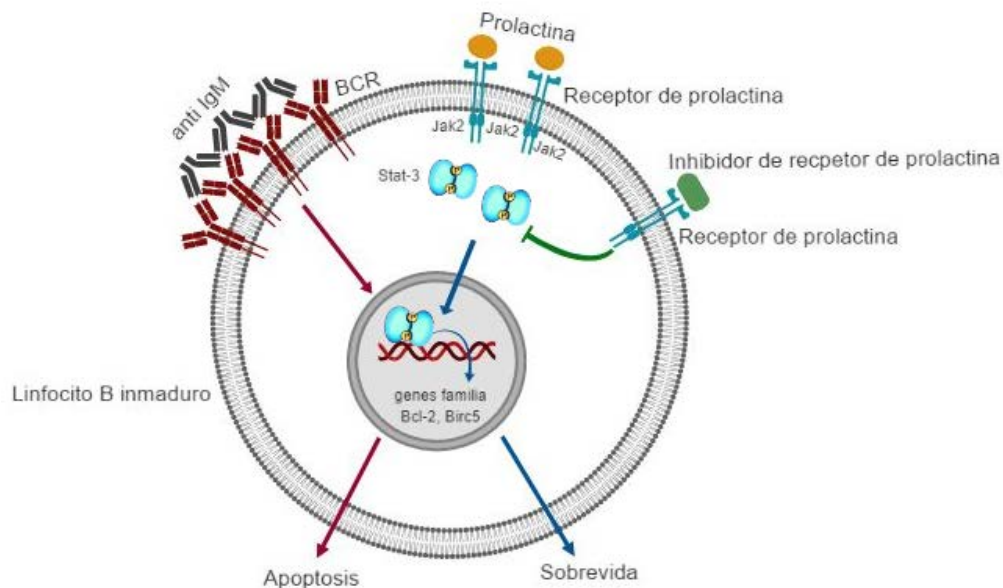


Figura 32. Mecanismo de acción de la PRL en linfocitos B inmaduros de ratones que desarrollan LES. Cuando los linfocitos B inmaduros son incubados con PRL y posteriormente se entrecruza el BCR con anticuerpos anti-IgM, la PRL es capaz a través de su receptor de activar la vía JAK-STAT3 promoviendo la translocación al núcleo de dímeros de STAT-3, los cuales promueven la transcripción de genes anti-apoptóticos, salvando así a las células de la apoptosis, y cuando se usa el inhibidor del receptor de prolactina este efecto se ve revertido.

Referencias

1. Nagasawa T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6:107–116.
2. Aurrand M and Mancini S. 2018. Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. *Int J Mol Sci.* 10:19(8).
3. Miyan T., Takano J., Endo T A., Kawakami E., Agata Y., Motomura Y., Kubo M., Kashima Y., Suzuki Y., Kawamoto H., Ikawa T. 2018. Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. *Genes Dev.* 15:112-126.
4. Lin Y C., Jhunjhunwala S., Benner C., Heinz S., Welinder E., Mansson R., Sigvardsson M., Hagman J., Espinoza C A., Dutkowski J., Ideker T., Glass CK., Murre C. 2010. A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat Immunol.* 11:635-643.
5. Schwickert T A., Tagoh H., Gültekin S., Dakic A., Axelsson E., Minnich M., Ebert A., Werner B., Roth M., Cimmino L., Dickins RA., Zuber J., Jaritz M., Busslinger M. 2014. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol.* 15:283-293.
6. Kleiman E., Loguercio S., Feeney A J. 2018. Epigenetic Enhancer Marks and Transcription Factor Binding Influence V κ Gene Rearrangement in Pre-B Cells and Pro-B Cells. *Front Immunol.* 9:2074
7. Matheson LS., Bolland D J., Chovanec P., Krueger F., Andrews S., Koohy H., Corcoran A E. 2017. Local Chromatin Features Including PU.1 and IKAROS Binding and H3K4 Methylation Shape the Repertoire of Immunoglobulin Kappa Genes Chosen for V(D)J Recombination. *Front Immunol.* 8:1550
8. Schaumann D H., Tuischer J., Ebell W., Manz R A., Lauster R. 2007. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage

- progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. *Mol Immunol.* 44:1606-1612.
9. Fistonich C., Zehentmeier S., Bednarski J. J., Miao R., Schjerven H., Sleckman BP., Pereira J. P. 2018. Cell circuits between B cell progenitors and IL-7⁺ mesenchymal progenitor cells control B cell development. *J Exp Med.* 215:2586-2599.
 10. Hardy R. and Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19:595–621.
 11. Kurosaki T., Shinohara H. and Baba Y. 2010. B cell signalling and fate decision. *Annu. Rev. Immunol.* 28:21–55.
 12. Schatz D. and Yanhong J. 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11:251-263.
 13. Carmona LM., Fugmann SD., Schatz DG. 2016. Collaboration of RAG2 with RAG1-like proteins during the evolution of V(D)J recombination. *Genes Dev.* 30:909-917.
 14. Lutz J., Heideman M R., Roth E., Van den Berk P., Müller W., Raman C., Wabl M., Jacobs H., Jäck HM. 2011. Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:10644-10649.
 15. Winkler TH. and Mårtensson IL. 2018. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front Immunol.* 15:2423.
 16. Ochiai K., Maienschein-Cline M., Mandal M., Triggs JR., Bertolino E., Sciammas R., Dinner A R., Clark M R., Singh H. 2012. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat Immunol.* 13:300-307.
 17. Herzog S., Reth M., Jumaa H. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 3:195-205.
 18. Nemazee D., Kouskoff V., Hertz M., Lang J., Melamed D., Pape K., Retter M. 2000. B-cell-receptor-dependent positive and negative selection in immature B cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2:57-71.
 19. Allende ML., Tuymetova G., Lee BG., Bonifacino E., Wu YP., Proia RL. 2010. S1P1

- receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med.* 207:1113-1124.
20. Pereira J P., Xu Y ., Cyster JG . 201 0. A r ole f or S 1P and S 1P1 i n immature-B cell egress from mouse bone marrow. *PLoS One.* 5(2):e9277.
 21. Smulski CR. and Eibel H. 2018. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front Immunol.* 9:2285.
 22. Basten A. and Silveira A. 2010. B cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* 22:566-574.
 23. Von Boehmer H. and Melchers F. 2010. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 11:14-20.
 24. Nemazee D . 2 017. Mechanisms of c entral t olerance f or B c ells. *Nat Rev Immunol.* 5:281-294.
 25. Nemazee D. 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 6:728-40.
 26. Pelanda R. and Torres R. 2006. Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* 18:184-190.
 27. Nemazee D. and Burki K. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 337:562-566.
 28. Cambier J., Gauld S., Merrell K. and Vilen B. 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?. *Nat. Rev. Immunol.* 7:633–643.
 29. Yurasov S., Waremann H., Hammersen J., Tsuiji M., Meffre E., Pascual V. and Nussenzweig M. 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201:703-711.
 30. Chang NH., Manion KP., Loh C., Pau E., Baglaenko Y., Wither JE. 2017. Multiple tolerance defects contribute to the breach of B cell tolerance in New Zealand Black chromosome 1 congenic mice. *PLoS One.* 12(6):e0179506
 31. Lamoureux J., Watson L., Cherrier M., Skog P., Nemazee D. and Feeney A. 2007. Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* 204:2853-2864.
 32. Chang SH., Kim T J., Kim YJ., Liu Y., Min SY., Park MJ., Park HS., Lee SK., Nam KH., Kim H Y., Mohan C ., Kim H R. 2014. The lupus s usceptibility l oocus S le1 facilitates t he p eripheral dev elopment and s election of anti-DNA B cells through

- impaired receptor editing. *J Immunol.* 192:5579-5585.
33. Kat I., Makdasi E., Fischel R. and Eilat D. 2009. B-cell anergy is maintained in anti-DNA transgenic NZB/NZW mice. *Internat. Immunol.* 22:101-111.
 34. Kaul A., Gordon C., Crow M., 2016. Systemic Lupus Erythematosus. *Nat Rev Disaes Primer.* 2:1-21.
 35. Tsokos G. 2011. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 365;22 2110-2121.
Mok C. and Lau C. 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* 56:481–490.
 36. Wahren-Herlenius, M., & Dörner, T. 2013. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *The Lancet*, 382: 819-831.
 37. Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, et al. 2006. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med.* 203:2255-2261.
 38. Jury EC., Flores-Borja F., Kalsi HS., Lazarus M., Isenberg DA., Mauri C., and Ehrenstein MR. 2010. Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 40:569-578.
 39. Dörner T., Giesecke C. and Lipsky P. 2011. Mechanism of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Research & Therapy* .13:243.
 40. Tobón GJ., Izquierdo JH., Cañas CA. 2013. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013:827254.
 41. Hanaoka H., Okazaki Y., Satoh T., Kaneko Y., Seta N., Kuwana M. 2012. Circulating anti-double-stranded DNA antibody-secreting cells in patients with systemic lupus erythematosus: a novel biomarker for disease activity.
 42. Choi, J., Kim, S. T., & Craft, J. 2012. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus—an update. *Current Opinion in Immunology*, 24: 651-657.
 43. Celhar T., Fairhurst AM. 2017. Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories. *Rheumatology.* 1:56.
 44. Li W., Titov AA., Morel L. 2017. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol.* 29: 434-441.
 45. Clark AG., Fan Q., Brady GF., Mackin KM., Coffman ED., Weston ML., Foster MH. 2013. Regulation of basement membrane-reactive B cells in BXSB, (NZBxNZW)F1,

- NZB, and MEL/lpr lupus mice. *Autoimmunity*. 46: 188-204.
46. Rudofsky, U., Evans, B., & Balaban, S. (1993). Differences in expression of lupus nephritis in New Zealand Mixed H-2z homozygous inbred strains of mice derived from New Zealand Black and New Zealand White mice: origins and initial characterization. *Laboratory Investigation*, 68, 419-426.
47. Blair PA., Chavez-Rueda KA, Evans JG., Shlomchik MJ., Eddaoudi A., Isenberg DA., Ehrenstein MR., and Mauri C. 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol*. 182: 3492-3502.
48. Petri M. 2008. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 17:412-415.
49. Borba VV., Zandman-Goddard G., Shoenfeld Y. 2018. Prolactin and Autoimmunity. *Front Immunol*. 12: 9-73.
50. Freeman M., Kanycska B., Lerant A. and Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev*. 80:1523-1587.
51. Ignacak A., Kasztelnik M., Sliwa T., Korbut R., Rajda K. and Guzik T. 2012. Prolactin Not only lactotrophin. A “new view of the old” hormone. *J. of Physiology and Pharmacology*. 63:5:435-443.
52. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2015. 11:265-275.
53. Brooks CL. 2012. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev*. 33: 504-525
54. Binart N., Barchelot A. and Bouilly J. 2010. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol. Metab*. 21:362-368.
55. Bouilly J., Sonigo C., Auffret J., Gibori G. and Binart N. 2012. Prolactin signaling mechanism in ovary. *Mol. and Cell Endocrinol*. 356:80–87.
56. Gorvin CM. 2015. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol*. 16: 85-91.
57. Reuwer A, Nowak-Sliwinska P, Mans L, Van der Loos C, Von der Thüsen J, Twickler M, S pek A , G offin V , G riffioen A . and B orensztajn K . 2012. F unctional

consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *J. Cell. Mol. Med.* 16: 2035-2048.

58. Creamer B, Sakamoto K, Schmidt J, Triplett A, Moriggl R, and Wagner K. 2010. Stat5 Promotes Survival of Mammary Epithelial Cells through Transcriptional Activation of a Distinct Promoter in Akt1. *Molecular and Cellular Biology.* 30: 2957–2970.
59. Jabbour H, Critchley H, and Boddie S. 1998. Expression of Functional Prolactin Receptors in Nonpregnant Human Endometrium: Janus Kinase-2, Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (STAT1), and STAT5 Proteins Are Phosphorylated after Stimulation with Prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 83: 2545-2552.
60. Gubbay O, Critchley H, Bowen J, King A and Jabbour H. 2002. Prolactin Induces ERK Phosphorylation in Epithelial and CD56+ Natural Killer Cells of the Human Endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 87:2329–2335.
61. Coss D, Benson C, Yang L, Ingleton P, Luben R, and Walker A. 1999 Dissociation of Janus Kinase 2 and Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Activation after Treatment of Nb2 Cells with a Molecular Mimic of Phosphorylated Prolactin. *Endocrinology.* 140: 5087-5094.
62. Tripathi A. and Sodhi A. 2008. Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways. *Int Immunol.* 3:327-336
63. Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac. Rec.* 47:119-129.
64. Nagy E., Berczi I., Wren G., Asa S. and Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacol.* 6:231-243.
65. Spangelo B., Farrimond D., Pompilius M. and Bowman K. 2000. Interleukin-1 beta and thymic peptide regulation of pituitary and glial cell cytokine expression and cellular proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:597-607.
66. De Laurentiis A., Pisera D., Caruso C., Candolfi M., Mohn C., Rettori V. and Seilicovich A. 2002. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic

pituitary axis. *Neuroimmunomodulation*. 10:30-39.

67. Blanco E J., Carretero-Hernandez M., García Barrado J., Iglesias Osmá M C., Carretero M., Herrero JJ., Rubio M., Riesco JM. 2013. The activity and proliferation of pituitary prolactin-positive cells and pituitary VIP-positive cells are regulated by interleukin 6. *Histol Histopathol*. 28: 1595-1604.
68. Sodhi A. and Tripathi A. 2008. Prolactin induced production of cytokines in macrophages involves Ca⁺⁺ and p42/44 MAP kinase signaling pathway. *Growth Factors*. 4:212-219.
69. Yang L., Hu Y., Li X., Zhao J., Hou Y. 2006. Prolactin modulates the functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 9:1478-1486.
70. Matera L. and Mori M. 2000. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 917:505-513.
71. Carreño P., Sacedon R., Jimenez E., Vicente A. and Zapata A. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol*. 160:135-145.
72. Gorvin, C. M. 2015. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2: 85-91.
73. Chavez, K., Hernandez, J., Zenteno, E., Leños, A., Legorreta, M., & Blanco, F. 2005. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clinical Immunology*, 116: 182-191.
74. Tomio, A., Schust, D. J., Kawana, K., Yasugi, T., Kawana, Y., Mahalingaiah, S., Taketani, Y. 2008. Prolactin can modulate CD4⁺ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and Cell Biology*, 86: 616-621.
75. Takizawa, K., Kitani, S., Takeuchi, F., & Yamamoto, K. 2005. Enhanced Expression of CD69 and CD25 Antigen on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Prolactin. *Endocrine Journal*, 52: 635-641.
76. Morales P., Carretero M., Geronimo H., Copín S., Gaspar M., Marcos M. and Martín J. 1999. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid

precursors. *Cell Growth Differ.* 10:583-590.

77. Richards, S. M., Garman, R. D., Keyes, L., Kavanagh, B., & Mcpherson, J. M. 1998. Prolactin Is an Antagonist of TGF- β Activity and Promotes Proliferation of Murine B Cell Hybridomas. *Cellular Immunology*, 184: 85-91.
78. Zhang, J., Sun, R., & Tian, Z. 2006. Human Prolactin Promotes Human Secondary Immunoglobulin Response in Human/SCID Mouse Chimeras. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14; 60-64.
79. Sun R., Gault R., Welniak L., Tian Z., Richards S. and Murphy W. 2003. Immunologic and hematopoietic effects of recombinant human prolactin after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* 9:426-434.
80. Horseman N., Zhao W., Montecino E., Tanaka M., Nakashima K., Engle S., Smith F., Markoff E. and Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16:6926-6935.
81. Bouchard B., Ormandy C., Di Santo J. and Kelly P. 1999. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 163:576-582.
82. Karimifar M , Tahmasebi A , Bonakdar Z , et al. 2013 . Correlation of serum prolactin levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 33:511-516.
83. Yang J, Li Q, Yang X, Li M. 2016. Increased serum level of prolactin is related to autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 25:513-519
84. Song GG., Lee YH. 2017. Circulating prolactin level in systemic lupus erythematosus and its correlation with disease activity: a meta-analysis. *Lupus.* 26: 1260-1268.
85. Montoya E., Cervera H., Chávez L., Legorreta MV., Sánchez L., Chávez K., Blanco F. 2011. Prolactin promoter polymorphisms (-114 G/T) is associated with anti-DNA antibodies in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest.* 6: 614-626.
86. Treadwell EL., Wiley K., Word B., Melchior W., Tolleson WH., Gopee N., Hammons G., Lyn-Cook BD. 2015. Prolactin and Dehydroepiandrosterone levels in women with

systemic lupus erythematosus: the role of the extrapituitary prolactin promoter polymorphism at -1149G/T. *J Immunol Res* 2015: 435658.

87. Chávez K., Legorreta VM., Cervera H., Sánchez L., Jara LJ., Zenteno E., Chávez L., Blanco F. 2007. Effect of prolactin on lymphocyte activation from systemic lupus erythematosus patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1108:157-165.
88. Legorreta MV., Chávez K., Chávez L., Cervera H., Zenteno E., Barile L., Burgos R., Álvarez E., Blanco F. 2016. Function of Treg cells decreased in patients with systemic lupus erythematosus due to the effect of prolactin. *Medicine.* 95(5):e2384
89. Elbourne KB., Keisler D., McMurray RW. 1998. Differential effects of estrogen and prolactin on an autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 7: 420-427.
90. McMurray R., Keisler D., Kanuckel K., Izui S. and Walker S. 1991. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J. Immunol.* 147:3780
91. Ledesma Y., Blanco F., Fuentes E., Tesoro E., Hernández R., Arriaga L., Legorreta M., Montoya E., Chávez L., Castro M. and Chávez K. 2012. Higher levels of PRL receptor in Transitional 1 B cells correlates with increased numbers of this population after PRL treatment and an early onset of lupus symptoms. *BMC Immunology.* 13:11
92. Peeva E. Michael D., Cleary J., Rice J., Chen X. and Diamond B. 2003. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J. Clin. Invest.* 111:275-283.
93. Jeganathan V., Peeva E., Diamond B. 2014. Hormonal milieu at time of B cell activation controls duration of autoantibody response. *J Autoimmun.* 53: 46-54.
94. Venkatesh J., Peeva E., Xu X. and Diamond B. 2006. Cutting Edge: Hormonal Milieu, Not Antigenic Specificity, Determines the Mature Phenotype of Autoreactive B Cells. *J. Immunol.* 176:331-3314.
95. Saha S., Gonzalez J., Rosenfeld G., Keiser H. and Peeva E. 2009. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis. Rheum.* 60:1743-1752.
96. Gonzalez J., Saha S., Peeva E. 2013. Prolactin rescues and primes autoreactive B cells directly and indirectly through dendritic cells in B6.Sle3 mice. *Clin Exp Immunol.* 172: 311-320.

97. Legorreta M., Flores R., Blanco F., Fuentes E., Chávez L., Hernández R., Tesoro E., Arriaga L. and Chávez 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*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/287469>.
98. Katz E., Lord C., Ford C., Gauls S., Carter N. and Harnett M. 2004. Bcl-xL antagonism of BCR-coupled mitochondrial phospholipase A2 signalling correlates with protection from apoptosis in WEHI-231 B cells. *Blood*. 103:168-176.
99. Meng J, Tsai-Morris C, Dufau M. 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*. 64:5677-5682.
100. Van Coppenolle F, Skrymgeour R. 2004. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K+ channel activation. *Biochem J*. 377:569-578
101. Yonezawa T, Chen K, Ghosh M, Rivera L, Dill R, Ma L, Villa P, Kawaminami M, Walker A. 2015. Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Letters*. 366:84-92.
102. Asai-Sato M, Nagashima Y, Miyagi E, Sato K, Ohta I, Vonderhaar BK, Hirahara F. Prolactin inhibits apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by serum starvation or cisplatin treatment. 2005. *Int J Cancer*. 115:539-44.
103. Hsu PC., Hour TC., Liao YF., Hung YC., Liu CC., Chang WH., Kao MC., Tsay GJ., Hung HC., Liu GY. 2006. Increasing ornithine decarboxylase activity is another way of prolactin preventing methotrexate-induced apoptosis: crosstalk between ODC and BCL-2. *Apoptosis*. 11:389-99.
104. Kawaminami M, Shibata Y, Yaji A, Kurusu S, Hashimoto I. 2003. Prolactin inhibits annexin 5 expression and apoptosis in the corpus luteum of pseudopregnant rats: involvement of local gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 144:3625-31.
105. Kochendoerfer S., Krishnan N., Buckley D. and Buckley A. 2003. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J. Endocrinol*. 178:265-73.

106. Malissein E., Verdleer M., Ratinaud M. and Trotaud D. 2006. Activation of Bad trafficking is involved in the BCR mediated apoptosis of immature B cells. *Apoptosis*. 11:1003-1012.
107. Al-Sakkaf K, Mooney L, Dobson P. and Brown B. 2000. Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *J of Endocrinol*. 167:85-92.
108. Longo P., Laurenti L., Gobessi S., Sica S., Leone G., Efremov D. 2007. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells.
109. Shenoy A R., Kirschnek S., Hacker G. 2014, IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells. *Eur J Immunol*. 44: 2500-2507.
110. Vier J., Groth M., Sochalska M., Kirschnek S. 2016. The anti-apoptotic Bcl-2 family protein A1/Bfl-1 regulates neutrophil survival and homeostasis and is controlled via PI3K and JAK/STAT signalling. *Cell Death Dis*. 18;7:e2103.
111. Peeva E., Gonzalez J., Hicks R. and Diamond B. 2006. Cutting edge: lupus susceptibility interval Sle3/5 confers responsiveness to prolactin in C57BL/6 mice. *J. Immunol*. 177:1401- 1405.
112. Vikström IB., Slomp A., Carrington EM., Moesbergen LM., Chang C., Kelly GL., et al. 2016. MCL-1 is required throughout B-cell development and its loss sensitizes specific B-cell subsets to inhibition of BCL-2 or BCL-XL. *Cell Death Dis*. 7(8):e2345
113. Carrington EM., Zhan Y., Brady JL., Zhang JG., Sutherland RM., Anstee NS., et al. 2017. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ*. 5: 878-888.
114. Adams CM., Kim AS., Mitra R., Choi JK., Gong JZ., Eischen CM. BCL-W has a fundamental role in B cell survival and lymphomagenesis. 2017. *Br J Clin Invest*. 127: 635-650.
115. Métais JY., Winkler T., Geyer JT., Calado RT., Aplan PD., Eckhaus MA., Dunbar CE. 2012. BCL2A1A over-expression in murine hematopoietic stem and progenitor cells decreases apoptosis and results in hematopoietic

- transformation. PLoS One. 7(10):e48267.
116. Miletic A V., Jellusova J ., Cato M H., Lee C R., Baracho G V., Conway EM., Rickert RC. 2016. Essential role for survivin in the proliferative expansion of progenitor and Mature B cells. *J Immunol.* 196: 2195-2204.
 117. Correale J, Farez M, Ysraelit M. 2014. Role of prolactin in B cell regulation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunol.* 269:76-86.
 118. Kusner LL ., Ciesielski M J., Marx A ., Kaminski H J., Fenstermaker R A. 2014. Survivin as a potential mediator to support autoreactive cell survival in Myasthenia Gravis: a human and animal model study. *PLoS One.* 9(7):e102231.
 119. Svensson B., Hafstrom I., Forslin K., Albertsson K., Tarkowski A., Bokarewa M. 2010. Increased expression of proto-oncogene surviving predicts joint destruction and persistent disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Med.* 42: 45-54.
 120. Isgren A., Forslind K., Erlandsson M., Axelsson C., Andersson S., Lund A., et al. 2012. High surviving levels predict poor clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 41: 652-657.
 121. Molad Y., Amit-Vasina M., Bloch O., Yona E., Rapoport M. 2009. Increased ERK and JNK activities correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 69: 175-180.
 122. Bloch O., Amit-Vazina M., Yona E., Molad Y. and Rapoport M. 2014. Increased ERK and JNK activation and decreased ERK/JNK ratio are associated with long-term organ damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 53: 1034-1042.
 123. Lee J K., Won C ., Yi EH ., Seok SH ., Kim M H., Kim SJ ., et al . 2013. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) contributes to T-cell homeostasis by regulating pro-survival Bcl-2 family genes. *Immunology.* 140(3):288-300.
 124. Ramírez A., López E., Martínez P., Estrada C., González R., Fafutis M., et al. 2015. STAT3 activation is required for the antiapoptotic effect of prolactin in cervical cancer cell. *Cancer Cell Int.* 15:83.
 125. Radhakrishnan H., Ilm K., Shirasawa S., Sasazuki T., Daniel P., Gillissen B., Stein U. 2017. MACC1 regulates Fas mediated apoptosis through STAT1/3-Mcl-1 signalling in solid cancers. *Cancer Lett.* 403: 231-245.

126. Pallares J., Martínez J., Dolcet X., Llobet D., Rue M., Palacios J., Prat J., Matias G. 2005. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3. *Int J Gynecol Pathol.* 3: 247-253.
127. Cataldo L., Chen N., Yuan Q., Li W., Ramammorthy P., Wagner T, Sticca R., Chen W. 2000. Inhibition of oncogene STAT3 phosphorylation by a prolactin antagonist, hPRL-G129R, in T-47D human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 17: 1179-1185.
128. Beck M., Peirce S. and Chen W. 2002. Regulation of bcl-2 gene expression in human breast cancer cells by prolactin and its antagonist, hPRL-G129R. *Oncogene.* 21: 5047-5055.