
SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BÁSICAS ORIENTACIÓN BIOLOGÍA

Estudio de la expresión del receptor de la prolactina en linfocitos y de la prolactina como blanco de la respuesta autoinmune frente al estrés

Autor: Facundo Ariel Agüero

Director: Dr. Juan Pablo Mackern- Oberti

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU-CONICET Mendoza). Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo

Co - director: Dr. Israel Aníbal Vega

Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM-CONICET). Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Cuyo

Año 2017

Contenido

1	Resumen	3
2	Introducción.....	4
3	Hipótesis	10
4	Objetivos	11
5	Materiales y métodos	13
5.1	Actividad 1.....	13
5.1.1	Materiales y métodos:.....	14
5.2	Actividad 2.....	16
5.2.1	Materiales y métodos:.....	17
5.3	Actividad 3.....	17
5.3.1	Materiales y métodos:.....	18
5.4	Actividad 4.....	20
5.4.1	Materiales y métodos:.....	20
6	Resultados.....	21
6.1	Actividad 1.....	21
6.2	Actividad 2.....	23
6.3	Actividad 3.....	24
6.4	Actividad 4.....	28
7	Discusión y conclusiones	32
8	Referencias	37

Agradecimientos

A mi familia, especialmente a mi madre, padre y hermana.

A Juan Pablo, Israel mis directores quienes me enseñaron y acompañaron en esta etapa final.

A los compañeros de carrera Nicolás, Josefina M, Josefina W, Florencia, Gabriela A, Laura, Sandra, Juan Pablo y especialmente a Gabriela G e Ismael.

A todo el personal de Imbecu, especialmente a Marta, Gisela, Elisa, Flavia, Romina A, Florencia, Romina Q, Andrés, Fiorella, Esteban y Patricia que me asistieron amablemente en el transcurso del trabajo.

A todos los profesores, especialmente Luis Marone y Néstor Ciocco.

Y a todos los amigos, compañeros y científicos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A todos ellos, ¡Gracias!

REFERENCIAS SIGLAS

PRL: Prolactina; PRL-R: Receptor de prolactina; PRL-RLF: Isoforma larga del receptor de prolactina; PRL-RS: Isoforma corta del receptor de prolactina; HPA: Eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal; LES: Lupus Eritematoso Sistémico; AR: artritis reumatoide; DM1: Diabetes Mellitus tipo 1; FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante; NOD: ratones diabéticos no obesos; EAC: Estrés aleatorio crónico; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima.

1 RESUMEN

La etiología de las enfermedades autoinmunes es desconocida por lo que es prioritario, desde el ámbito de la salud pública, avanzar en el conocimiento de la misma. Además, la ausencia de terapias eficientes para el tratamiento de enfermedades autoinmunes resalta la importancia del estudio de los mecanismos inmunopatogénicos presentes en la autoinmunidad. Este escenario ha promovido el desarrollo científico y diseño de nuevas herramientas para su seguimiento y pronóstico. Se ha postulado que las hormonas liberadas en respuesta al estrés, como los corticoides y la prolactina, pueden gatillar el inicio de enfermedades autoinmunes (o desencadenar una recaída) a través de la modulación funcional de linfocitos. En el presente proyecto evaluamos (a) la expresión de las diferentes isoformas del receptor de prolactina durante la activación linfocitaria; y (b) la presencia de

autorreactividad contra prolactina, FSH y LH en un modelo experimental de autoinmunidad (Diabetes Mellitus tipo 1) bajo condiciones de estrés.

2 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de los animales está compuesto por una gran diversidad de células y moléculas cuya función es defender al organismo de patógenos. Entre este conjunto de actores del sistema inmune, los linfocitos cumplen una función primordial durante la respuesta inmune potenciando los mecanismos de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa (1). Por el contrario, un desbalance funcional en la población de linfocitos podría incrementar la susceptibilidad a desarrollar enfermedades autorreactivas o autoinmunes (2). Sin embargo, la etiología de las enfermedades autoinmunes, las cuales son producidas por una respuesta inmune dirigida hacia moléculas o antígenos propios, todavía es desconocida (3, 4).

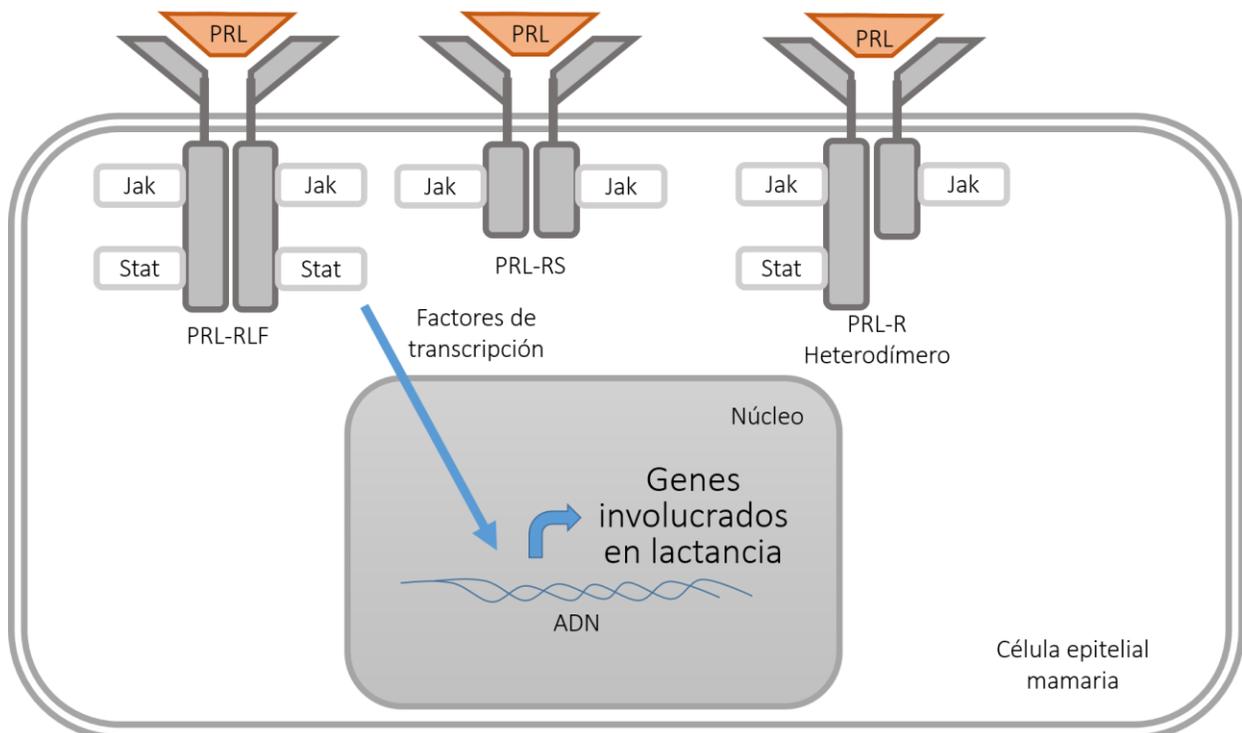
Aunque, durante los últimos años el diseño de terapias basadas en la modulación del sistema inmune ha crecido exponencialmente, aún no se han desarrollado terapias específicas y eficaces que permitan controlar trastornos autoinmunes sistémicos (5, 6). La mayoría de las terapias actuales se basan en la administración de drogas que producen una supresión generalizada del sistema inmunológico con severas complicaciones y efectos adversos (7). En el ámbito científico se ha planteado la necesidad de avanzar en la identificación de los mecanismos fisio-patogénicos primordiales en el desarrollo de

autoinmunidad con el objeto de diseñar terapias efectivas que reduzcan la respuesta autoinmune y al mismo tiempo resguarden la competencia del sistema inmune. Por otro lado, la identificación de nuevos autoanticuerpos contra antígenos propios con funciones fisiológicas críticas como las hormonas podría colaborar con una correcta aplicación de terapias inmunomoduladoras junto con una intervención de la función afectada por la autorreactividad.

Actualmente, se postula que múltiples factores intervienen en el desencadenamiento de las enfermedades autoinmunes, incluyendo componentes genéticos, ambientales, infecciosos, psicológicos y hormonales. En su conjunto, estos factores podrían alterar el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) confiriendo una mayor susceptibilidad o mayor riesgo de contraer la enfermedad, pero sin asegurar su desarrollo (8-10). La alta incidencia de enfermedades autoinmunes sobre el sexo femenino, respecto del masculino, sugiere que la homeostasis hormonal del género femenino es un factor de riesgo importante en donde estradiol y prolactina cumplen un rol fundamental en la activación y proliferación linfocitaria (11). Este factor es sumamente complejo debido a que la sensibilidad celular a las diferentes hormonas depende de la expresión y naturaleza de su receptor.

Las acciones biológicas de PRL están mediadas por su receptor (PRL-R) (12), el cual está formado por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio transductor de señales intracelular altamente conservado entre diferentes especies de mamíferos (13). La señalización de PRL en linfocitos y células del sistema inmune induce la activación de las mismas

(14). El gen del PRL-R contiene diferentes exones, que por empalmes alternativos, pueden generar diversas isoformas. Estas isoformas poseen un dominio extracelular idéntico, pero difieren en el tamaño y la secuencia de la porción intracelular, que puede ser corta, larga o intermedia presentando algunas diferencias entre humano y murino (15). Existen diferentes isoformas cortas del PRL-R (PRL-RS), y algunas carecen de una fracción del dominio citoplasmático y por consiguiente presentan diferencias en los mecanismos de señalización intracelular respecto a la isoforma larga (14). Estas diferencias llevan a que PRL-Rs sólo pueda mediar activación de las vías JAK, MAPK y AKT sin lograr activar la vía de STAT5b (15). La isoforma larga del PRL-R (PRL-RLF) forma dímeros y luego de la unión de una sola molécula del ligando (PRL) transmite señales a través de proteínas citoplasmáticas asociadas llevando a la activación de las vías STAT5b, JAK, MAPK y AKT (16). Los efectos específicos de prolactina sobre genes involucrados en las funciones clásicas de PRL están mediadas por la activación de STAT5b (17). Por otro lado, los heterodímeros, entre formas largas y cortas del receptor (PRL-RLF y PRL-RS), son funcionalmente inactivos y no pueden conducir las señales dadas por la isoforma larga (18). Además, podemos encontrar una isoforma soluble del PRL-R constituida solamente por la porción extracelular (19). Las isoformas PRL-RS y PRL-RLF se encuentran co-expresadas en diferentes tejidos incluyendo órganos linfáticos como timo y bazo, siendo la isoforma PRL-RLF la más expresada (20, 21). Sin embargo, estos reportes no identifican las isoformas específicas del PRL-RS.



Formas del receptor de PRL y transducción de señales al núcleo en célula del epitelio mamario.

La expresión, regulación y activación de las diferentes isoformas del PRL-R han sido estudiadas principalmente en el tracto reproductor femenino (22). Las diferentes isoformas están reguladas por un conjunto de mediadores del ciclo ovárico a través de mecanismos endocrinos, paracrinos y autocrinos (20). Por el contrario, la regulación de las diferentes isoformas en linfocitos activados es completamente desconocida. Debido a que alteraciones en la activación y señalización de linfocitos T puedan contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes, la identificación de nuevos blancos terapéuticos linfocitarios es de vital importancia para el diseño de tratamientos eficaces como así también la generación de nuevos marcadores pronósticos de la enfermedad (23).

Aunque el estrés emocional como agente etiológico de enfermedades autoinmunes no ha sido comprobado en su totalidad, la evidencia actual sugiere una correlación positiva entre el estrés y el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (24). La OMS estima que el estrés será una de las enfermedades más frecuentes en las próximas décadas, lo cual traería consigo una gran cantidad de problemas socio-económicos a nivel mundial (25).

El estrés tendría un rol agravante en la severidad de la enfermedad autoinmune impactando en la calidad de vida. Estudios indican que un 60% de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) reportan al estrés como desencadenante de una reactivación de la enfermedad (26). De forma similar, también hay evidencias indicando que el estrés exacerba los síntomas de la artritis reumatoide (AR) y diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (27, 28).

El estrés desencadena una respuesta particular mediada por comandos enviados por el sistema nervioso central que activan el eje HPA a través del factor liberador de corticotropina con la posterior liberación de adrenocorticotropina pituitaria, y la siguiente secreción de cortisol (29). Además se produce la liberación de prolactina (PRL) hipofisaria y la activación de diversos sistemas de neurotransmisores, entre ellos péptidos opioides (30). En presencia de un sistema inmune en donde existan fallas en la regulación de la activación celular mediada por hormonas, los linfocitos autorreactivos podrían recibir señales estimuladoras y escapar de los mecanismos de tolerancia periférica desencadenando una respuesta autoinmune.

Se ha demostrado que actividades del sistema nervioso a través del eje HPA promueven el agotamiento y disfunción de linfocitos T afectando la producción de citoquinas inflamatorias como IFN- γ y TNF- α (31). Paradójicamente, el estrés crónico también estaría promoviendo el desarrollo de autoinmunidad a través de mecanismos todavía desconocidos pero que estarían dados por las interacciones entre neurotransmisores, hormonas y células del sistema inmune en donde el eje sistema nervioso central - HPA es clave. Debido a esto, hormonas liberadas en respuesta al estrés como el cortisol y prolactina pueden tener diferentes efectos sobre las respuestas inmunes que dependen de sus concentraciones y del tiempo de exposición a los mismos (32).

Por otro lado, en ciertas situaciones y de forma muy interesante, prolactina podría actuar como autoantígeno siendo blanco de la respuesta autoinmune (33). Aunque la presencia de anticuerpos dirigidos a prolactina se ha visto asociado a ciertas condiciones autoinmunes, el rol patogénico de estos autoanticuerpos es aún desconocido. Posiblemente, la presencia de autoanticuerpos específicos para PRL esté involucrada en el deterioro de la función de las células lactotropas productoras de PRL en la hipófisis anterior, como así también en limitar la bioactividad de la misma en la circulación sanguínea (33). De forma interesante, en ciertas enfermedades autoinmunes, como el síndrome de Sjogren, donde el sistema inmunológico desarrolla autorreactividad contra glándulas lacrimales y salivales, el eje HPA se encuentra alterado afectando la respuesta normal frente al estrés (34).

Recientemente, se ha reportado la presencia de autoanticuerpos específicos para corticotrofina en individuos con alteraciones del comportamiento y respuesta del eje HPA al estrés (35). Sin embargo, el estudio del desarrollo de autoanticuerpos específicos para prolactina en respuesta al estrés en enfermedades autoinmunes no ha sido abordado previamente.

Aquí, nosotros postulamos que durante la activación linfocitaria, la expresión de PRL-RS se incrementa para conducir a un menor efecto estimulador de prolactina sobre la respuesta inmune mediada por PRL-RLF. En individuos susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes, alteraciones en la modulación de receptores como por ejemplo PRL-RS podrían gatillar el inicio y facilitar la progresión de patologías autoinmunes.

Por otro lado, el estrés podría desencadenar el desarrollo de autoanticuerpos específicos para PRL y antígenos hipofisarios como la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) en el modelo experimental de autoinmunidad NOD (ratones susceptibles al desarrollo de autoinmunidad específica de órgano) bloqueando la actividad de las mismas y exacerbando la patología autoinmune.

3 HIPÓTESIS

La expresión de las isoformas del receptor de prolactina (PRL-R) en esplenocitos está regulada en forma diferencial durante la activación celular. Las hormonas prolactina, FSH y LH, pueden ser blanco de una respuesta

autorreactiva en individuos susceptibles al desarrollo de autoinmunidad y dicha respuesta se incrementa durante una situación de estrés.

4 OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar la expresión de las diferentes isoformas del receptor de PRL en células del sistema inmune en ausencia y presencia de un estímulo policlonal y determinar la presencia de autoanticuerpos contra PRL, FSH y LH en un modelo animal experimental de autoinmunidad bajo condiciones de estrés crónico.

Objetivo específico 1: Estudiar la expresión de ARNm de las diferentes isoformas del PRL-R en esplenocitos de ratón.

Justificación: Las células inmunes poseen diferentes características fenotípicas que les permiten recircular y activarse en forma diferencial. La relación en la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R podría promover o limitar la recirculación, activación y proliferación de las diferentes subpoblaciones leucocitarias en presencia de PRL.

Resultados esperados: Se espera encontrar que esplenocitos de ratón expresen ambas isoformas, PRL-RS y PRL-RLF.

Objetivo específico 2: Estudiar la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R en esplenocitos durante la activación farmacológica *in vitro*.

Justificación: Durante la activación celular de los linfocitos T se inducen mecanismos regulatorios para controlar la activación y proliferación subsiguiente. La expresión relativa de las diferentes isoformas del PRL-R podría promover o limitar la activación y proliferación de los linfocitos T en presencia de PRL.

Resultados esperados: Se espera encontrar que la isoforma PRL-RS aumente durante la activación con un estímulo policlonal.

Objetivo específico 3: Estudiar la respuesta autorreactiva dirigida a PRL en un modelo experimental de autoinmunidad (Diabetes Tipo 1) y como se modula bajo condiciones de estrés crónico.

Justificación: Aunque es conocido que la cepa de ratones NOD es susceptible al desarrollo de autoinmunidad contra diferentes glándulas como el páncreas y tiroides, se desconoce si esta cepa de animales presenta una respuesta autorreactiva específica contra una hormona proteica producida por la glándula hipofisaria como PRL y menos aún si esta estaría asociada a episodios de estrés cuando la expresión de PRL se encuentra aumentada.

Resultados esperados: Se espera encontrar que ratones que naturalmente generan una respuesta autoinmune presenten autoanticuerpos contra PRL y que en condiciones de estrés esta respuesta se vea incrementada.

Objetivo específico 4: Estudiar la respuesta autorreactiva dirigida a FSH y LH en un modelo experimental de autoinmunidad (Diabetes Tipo 1) y como se modula bajo condiciones de estrés crónico.

Justificación: Aunque es conocido que la cepa de ratones NOD es susceptible al desarrollo de autoinmunidad contra diferentes glándulas como el páncreas y la tiroides como así también de una disminución en la fertilidad, se desconoce si esta cepa de animales presenta una respuesta autorreactiva específica contra hormonas hipofisarias FSH y LH, y aún si ésta respuesta inmunológica está asociada a episodios de estrés.

Resultados esperados: Se espera encontrar que ratones autoinmunes presenten autoanticuerpos contra FSH y LH y que en condiciones de estrés se vean incrementado.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

A los fines didácticos en este trabajo hemos decidido estratégicamente describir los materiales y métodos siguiendo cada uno de los objetivos planteados

5.1 ACTIVIDAD 1

EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DEL PRL-R EN ESPLENOCITOS MURINOS.

5.1.1 Materiales y métodos:

Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 45-60 días de edad. Los ensayos que involucraron animales de experimentación fueron conducidos de acuerdo a las normativas vigentes sobre bienestar animal reglamentadas por el Canadian Council on Animal Care. Las prácticas efectuadas con animales de experimentación cuentan con la autorización del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL Aval N°78/2016). Los animales fueron criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU) CCT - Mendoza, CONICET, bajo condiciones de agua y comida *ad libitum*, temperatura de 23 °C y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Obtención de esplenocitos.

La eutanasia de los ratones se realizó por suministro de dióxido de carbono en cámara y luego se extrajeron quirúrgicamente los bazos de los mismos. Los esplenocitos totales se obtuvieron por disgregación mecánica de los bazos usando mallas metálicas. A continuación se re-suspendieron las células en PBS y se trataron con reactivo TRIzol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante para extracción de ARN total de los esplenocitos.

Purificación ARN, síntesis de ADN copia (ADNc) y reacción de PCR.

Las muestras obtenidas en TRIzol fueron procesadas según las indicaciones del fabricante para la obtención de ARN total. Posteriormente 2 µg de ARN fueron utilizados para la obtención de ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar el ARN total fue incubado con 0,5 µg de random primers por 5 min a 70°C. Luego las muestras fueron incubadas con 1,25 mM de deoxinucleósidos trifosfato (Invitrogen) y 16 U de la enzima transcriptasa reversa indicada anteriormente por 1 hora a 42°C en el buffer de la reacción en un volumen final de 20µL. El ADNc obtenido fue utilizado para la amplificación usando cebadores específicos y protocolos de PCR estándar. Posteriormente las muestras fueron diluidas 10 veces (100µL volumen final de ADNc) y 5µL de ADNc (0,1µg de ARN inicial) fueron cicladas con 1,25 U de la TaqADN polimerasa, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM deoxinucleótidos trifosfatos (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) y 1µM de los oligonucleótidos sentido y antisentido de diferentes genes: GAPDH (housekeeping), isoforma larga del receptor de prolactina, isoforma corta 3 del receptor de prolactina. Todas las muestras se incubaron en un termociclador (MyCycler Thermal Cycles, BioRad). Las condiciones para semicuantificar la abundancia de ARNm fueron elegidas para que los productos de amplificación no alcancen un máximo al final de la reacción (25 ciclos).

Secuencias de cebadores utilizados:

Gen	Cebador Sentido	Cebador Antisentido
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTTC
PRL-RLF	ATAAAAGGATTTGATACTCATCTGCTAGAG	TGTCATCCACTTCCAAGAACTCC
PRL-RS3	TGCATCTTTCCACCAGTTCCGGGGC	TTGTATTTGCTTGGAGAGCCAGT

Electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 3%, tras 45 minutos a 80 V en cuba electroforética. El agente intercalante utilizado fue SYBR® Gold (Invitrogen). Para semicuantificar los niveles de ADNc, los geles fueron fotografiados, y las intensidades de las bandas fueron analizadas usando el software ImageJ. Las intensidades de banda relativas en cada reacción fueron normalizadas a la intensidad de banda de GAPDH. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias correspondiendo a la razón de la intensidad del gen en cuestión sobre la intensidad de banda GAPDH.

5.2 ACTIVIDAD 2

ESTUDIAR LA EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DEL PRL-R EN ESPLENOCITOS MURINOS DURANTE LA ACTIVACIÓN FARMACOLÓGICA IN VITRO.

5.2.1 Materiales y métodos:

Animales de experimentación; Obtención de esplenocitos; Purificación ARN, síntesis de ADN copia y reacción de PCR; Electroforesis en geles de agarosa se realizaron de la misma manera que en Actividad 1.

Cultivo de proliferación

Los esplenocitos obtenidos se incubaron durante 24hs en cultivo RPMI (Suero bovino fetal 5%) en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas a una densidad de 3 x 10⁵ células/reservorio. Se hicieron grupos de cultivo basales y grupo de cultivos tratado con concanavalina A (ConA), un superantígeno policlonal que induce activación y proliferación de mayoritariamente linfocitos T.

5.3 ACTIVIDAD 3

ESTUDIAR LA RESPUESTA AUTORREACTIVA DIRIGIDA A PRL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOINMUNIDAD (DIABETES TIPO 1) Y COMO SE MODULA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS CRÓNICO.

5.3.1 Materiales y métodos:

Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6, ratones NOD hembras y machos entre 45 y 120 días de edad.

La cepa NOD/ShiLtJ (comúnmente llamada NOD) es un modelo poligénico de diabetes mellitus tipo 1. La diabetes en ratones NOD se caracteriza por hiperglucemia e insulinitis, una infiltración leucocitaria de los islotes pancreáticos. La disminución en la producción de insulina pancreática se produce en las hembras NOD a partir de las 12 semanas de edad y a partir de las 16 semanas en los machos. El 80% de las hembras y el 45% de los machos se convierten en diabéticos en 30 semanas. En general, los fenotipos inmunes presentes en los ratones NOD consisten en defectos en la presentación antigénica, alteraciones en el repertorio de linfocitos T, disfunción de células NK y producción incrementada de citoquinas por macrófagos (Jackson Laboratory, 2017, URL: <https://www.jax.org/strain/001976>)

El tratamiento de estrés aleatorio crónico (EAC), fue aplicado solo a ratones NOD hembras por dos meses utilizando un protocolo modificado de Mariani *et al* 2003 (36) consiste en administrar en forma aleatoria una vez por semana los siguientes estímulos: aislamiento, inmovilización por una hora, natación forzada por seis minutos, inclinación de la jaula 45° por 24hs e iluminación del ciclo nocturno por 12hs.

Los animales fueron mantenidos como se especificó en Actividad 2. Protocolo CICUAL aprobado n°79/2016.

Obtención de suero.

Las muestras de sangre de ratón fueron obtenidas por punción de la vena maxilar. La sangre obtenida se recogió en tubos sin anticoagulante de manera de obtener suero. La muestra se dejó coagular por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 4000 rpm durante 4 min. Las muestras así obtenidas se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Evaluación de la respuesta autorreactiva humoral frente a antígenos hipofisarios.

Para evaluar la respuesta inmune humoral específica para diferentes antígenos se realizaron ensayos de ELISA. Para el antígeno Prolactina (MyBiosource) placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 10 µg/ml de PRL en buffer PBS. Luego de una incubación de una noche a 4 °C, los reservorios fueron lavados con PBS Tween-20 al 0,05% y posteriormente bloqueados con albumina sérica bovina al 5% en PBS por 2 h a 37 °C. Luego se incubaron con diluciones seriadas de los sueros de los diferentes grupos de animales por 1 h a 37°C. A continuación los reservorios fueron lavados e incubados con un anticuerpo secundario específico para IgG murina conjugado con peroxidasa contra el isotipo de interés por 1 hr a 37 °C. La reacción fue revelada con TMB

(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)/H₂O₂ (BD, EEUU) y la absorbancia fue medida a 450nm en un lector de placas de ELISA.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas T de Student para contrastar las medias de las absorbancias registradas.

5.4 ACTIVIDAD 4

ESTUDIAR LA RESPUESTA AUTORREACTIVA DIRIGIDA A FHS y LH EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOINMUNIDAD (DIABETES TIPO 1) Y COMO SE MODULA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS CRÓNICO.

5.4.1 Materiales y métodos:

Animales de experimentación.

Las cepas de animales utilizados fueron los mismos según se indica en actividad 3.

Evaluación de la respuesta autorreactiva humoral frente a antígenos hipofisarios.

Se procedió de igual manera que en actividad 3. Las placas para ensayos ELISA se sensibilizaron con antígenos FSH (NIH) y LH (NIH) (10µg/ml).

Igual a la actividad 3.

6 RESULTADOS

6.1 ACTIVIDAD 1

La información sobre la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R en esplenocitos es muy escasa (21). Más aún, hasta el presente, no hay estudios disponibles sobre la expresión de la isoforma corta 3 del receptor de Prolactina (PRL-RS3) en esplenocitos de ratón. Debido a esto, en una primera etapa, nos propusimos evaluar si esplenocitos de ratón son capaces de expresar las diferentes isoformas del PRL-R incluyendo la isoforma corta S3 y la isoforma larga. Para llevar a cabo nuestro primer objetivo, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre estudios de ARNm de las diferentes isoformas del PRL-R para obtener las secuencias de los cebadores específicos con un posterior análisis en BLASTn para corroborar la complementariedad de dichas secuencias. Como se puede observar en la **figura 1 A-C**, se observa una complementariedad del 100% de todos los oligonucleótidos.

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido	Identidad
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTC	19/19 (100%)
PRL-RLF	ATAAAAGGATTTGATACTCATCTGCTAGAG	TGTCATCCACTTCCAAGAACTCC	23/23 (100%)
PRL-RS3	TGCATCTTCCACCAGTTCCGGGGC	TTGTATTTGCTTGGAGAGCCAGT	23/23 (100%)

Figura 1: Alineamientos de cebadores utilizando BLASTn. Complementariedad entre los cebadores reverso y hacia adelante de cada uno de los genes investigados (GAPDH, PRL-RLF y PRL-RS3) utilizando el ADN transcripto de *Mus musculus*. En todos los casos la complementariedad fue del 100%.

Luego, los esplenocitos de ratón fueron utilizados para extraer ARN total mediante la técnica de TRIZOL y así evaluar la presencia de ARNm específico para las diferentes isoformas mediante RT-PCR convencional. Como se puede observar en la **figura 2A**, las diferentes muestras de esplenocitos presentaron un solo producto de PCR para GAPDH. Teniendo en cuenta la buena calidad de las muestras se procedió a evaluar si los esplenocitos expresaban ARNm PRL-RS3. Como se puede observar en la **figura 2B**, dos muestras diferentes de esplenocitos presentaron un solo producto específico del peso molecular esperado. Para nuestro conocimiento este es el primer reporte donde se evalúa en forma específica la isoforma PRL-RS3 en células del sistema inmune. Cuando evaluamos la presencia de ARNm específico de PRL-RLF también observamos la presencia del mismo (**Figura 2C**). Estos datos sugieren que la sensibilidad funcional a PRL por parte de los esplenocitos puede estar regulada por el balance en la expresión de las diferentes isoformas del receptor de prolactina, RPL-RL y PRL-RS3.

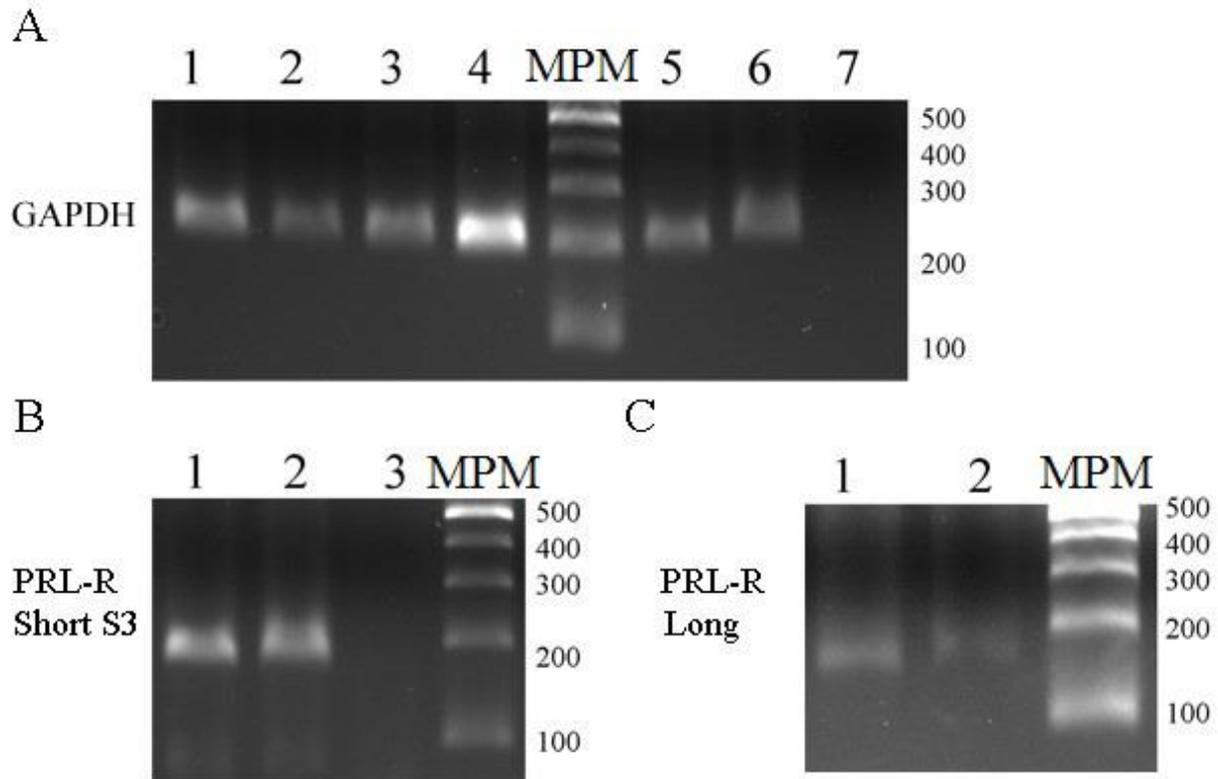


Figura 2: Identificación de la expresión de ARNm de las diferentes isoformas del PRL-R. **A)** Producto de PCR esperado para GAPDH de diferentes muestras de esplenocitos (1-6). La calle 7 corresponde al control negativo realizando la reacción en ausencia de templado. **B)** Producto de PCR esperado para PRL-RS3. Calles 1-2: Esplenocitos. Calle 3: control negativo (sin templado). **C)** Producto de PCR para PRL-RLF en dos muestras de esplenocitos (calles 1 y 2) MPM: marcadores de peso molecular.

6.2 ACTIVIDAD 2

Posteriormente se evaluó si la activación celular de los esplenocitos induce cambios en la expresión de ARNm de las diferentes isoformas para así modular la sensibilidad a prolactina. Para ello, esplenocitos aislados del bazo fueron cultivados y estimulados con concanavalina A por 24hs. Posteriormente se purificó ARN total, se sintetizó ADN copia y se realizó la semicuantificación por densidad óptica sobre geles de la abundancia de los transcritos de las diferentes isoformas del PRL-R. Para la semicuantificación de la expresión de

ARN por densidad óptica se utilizaron unidades arbitrarias de la intensidad del brillo de las bandas de cada isoforma respecto a la intensidad de brillo del gen control GAPDH. Como se puede observar en la **figura 3**, la activación celular no produce cambios en la expresión del PRL-RLF. Por el contrario, la activación celular induce un aumento en la expresión de ARNm de PRL-RS3 (resultados estadísticamente no significativos). Estos datos sugieren que durante la activación los linfocitos son capaces de cambiar la sensibilidad a prolactina.

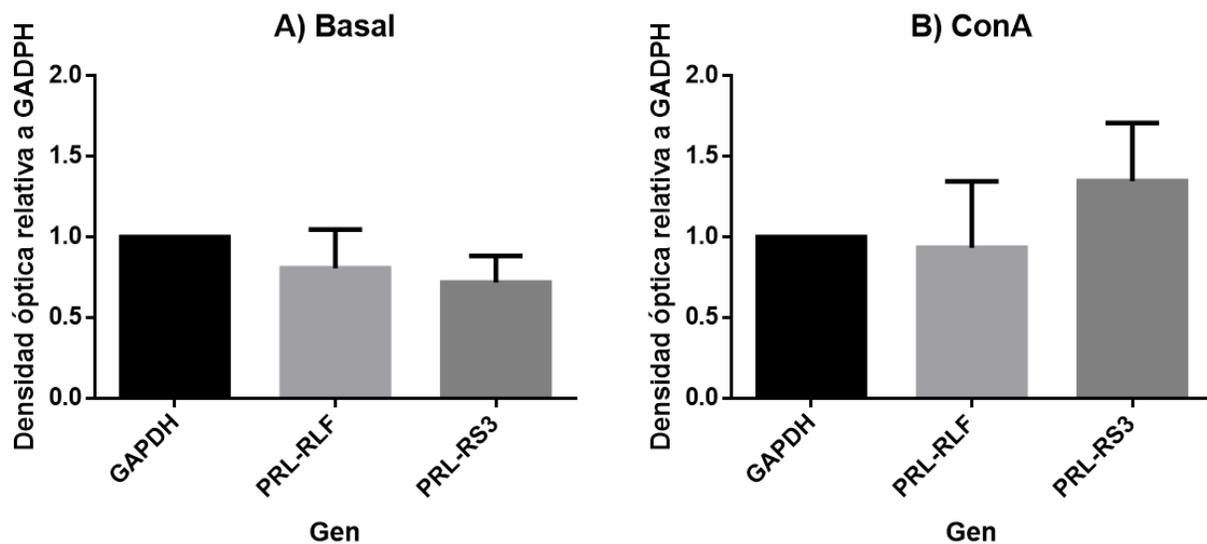


Figura 3: Densidad óptica relativa de cada isoforma del receptor de prolactina en relación a GAPDH. Esplenocitos cultivados en ausencia **(A)** o presencia **(B)** del superantígeno concanavalina A. Se utilizaron tres replicas (3 BSL y 3 ConA)

6.3 ACTIVIDAD 3

Teniendo en cuenta que moléculas propias como hormonas pueden ser blanco de una respuesta autorreactiva, se evaluó si ratones susceptibles al desarrollo de autoinmunidad desarrollan autoanticuerpos específicos para PRL. Para ello se determinó la presencia de IgG autorreactiva específica para PRL en

ratones NOD por la técnica de ELISA. Se utilizaron ratones hembras C57BL/6 como grupo control de ausencia de enfermedad autoinmune. Los datos obtenidos se expresaron como niveles de densidad óptica y se organizan según dilución de suero, cepa y edad.

En primer lugar se evaluó la producción de autoanticuerpos para el autoantígeno PRL en ratones NOD machos en diferentes etapas de su ciclo de vida. Como se observa en las **Figuras 4A y 4B**, el grupo de animales NOD Macho jóvenes no presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control C57BL/6. Por el contrario, con el aumento de la edad, los ratones NOD machos (adultos) desarrollaron autoanticuerpos contra PRL (P-valor: 0,0002). Estos resultados están de acuerdo con la autorreactividad reportada en nuestra cepa de animales donde el aumento de la edad incrementa la patología autoinmune (37). También, evaluamos en ratones hembras la respuesta inmune humoral específica para PRL. Como lo esperábamos, encontramos diferencia entre los grupos NOD y C57BL/6, siendo mayor en ratones hembras NOD tanto en dilución 1/50 como en 1/250 (**Figura 4C y 4D**). Estos resultados sugieren que PRL podría ser blanco de una respuesta autoinmune en la cepa de ratones NOD y que la presencia de este tipo de autoanticuerpos podría tener implicancias en la biología reproductiva femenina donde PRL cumple sus principales funciones.

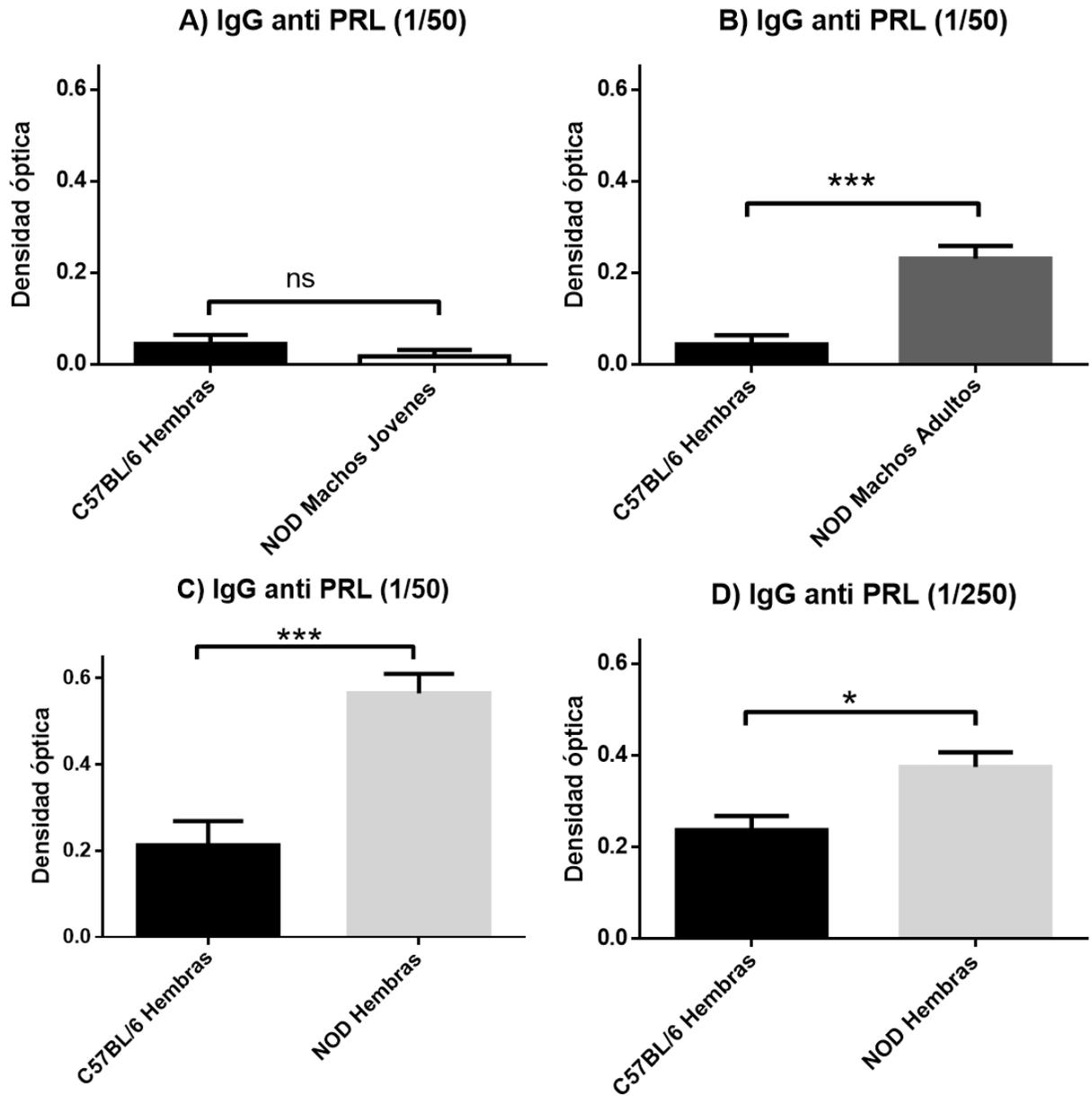


Figura 4: Respuesta humoral específica para antígeno PRL. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** C57BL/6 Hembras y NOD Machos Jóvenes (N = 7, P = 0,43). **B)** C57BL/6 y NOD Machos Adultos (N = 7, P = 0,0002). **C)** C57BL/6 y NOD, dilución 1/50 (N = 7, P = 0,0003). **D)** C57BL/6 y NOD, dilución 1/250 (N = 7, P = 0,0255).

Teniendo en cuenta que en los últimos años se evidenció que el estrés podría tener un rol en el inicio de enfermedades autoinmunes decidimos evaluar si la inducción de un estrés aleatorio crónico (EAC) es capaz de

incrementar el desarrollo de autoanticuerpos específicos para PRL en ratones NOD. Para ello, ratones NOD hembras fueron sometidas a EAC mediado por inmovilización, cambio del ciclo luz oscuridad, inclinación de jaula a 45°, natación forzada y aislamiento por un período de 3 meses. Tras verificar la presencia de autoanticuerpos específicos para PRL en ratones NOD, se procedió a evaluar los grupos de ratones NOD Hembras sin tratamiento y NOD hembras sometidas a EAC.

Como se puede observar en la **Figura 5A-B**, no observamos diferencias entre los grupos ensayados indicando que el estrés no estaría involucrado en aumentar la respuesta autorreactiva contra PRL en individuos susceptibles.

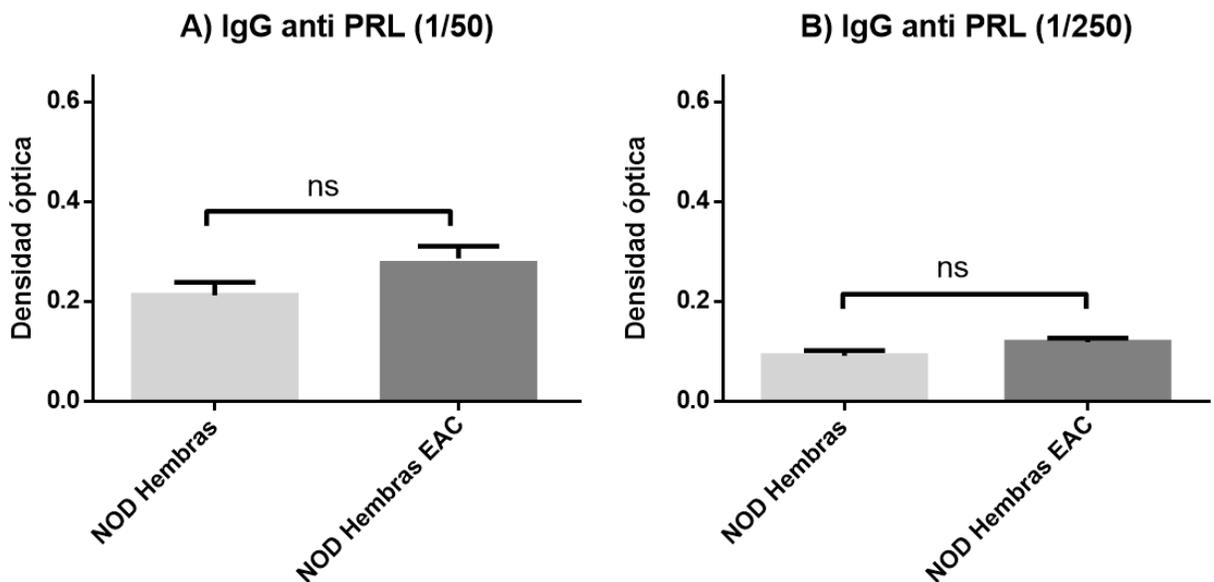


Figura 5: Respuesta humoral específica para antígeno PRL en ratones NOD Hembras. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** NOD Hembras y NOD Hembras EAC, dilución 1/50 (N = 7, P = 0,08). **B)** NOD Hembras y NOD Hembras EAC, dilución 1/250 (N = 7, P = 0,0762).

6.4 ACTIVIDAD 4

Teniendo en cuenta que la cepa de ratones NOD desarrolla autoinmunidad contra diferentes tipos de glándulas y que disminuye la fertilidad con el avance de la edad, nos propusimos evaluar la presencia de autoanticuerpos contra FSH y LH. Estas hormonas hipofisarias están involucradas en funciones reproductivas primordiales para mantener la fertilidad en un estado óptimo.

En primer lugar se evaluó la respuesta humoral autorreactiva para el antígeno FSH en los grupos C57BL/6 y NOD hembras, encontrándose diferencia estadísticamente significativa en la dilución de los sueros 1/50 (**Figura 6A**). En la dilución mayor, 1/200, no se encontró diferencia alguna en los niveles de autoanticuerpos aunque se mantuvo el mayor nivel de autoanticuerpos en el grupo de hembras NOD respecto a los niveles presentes en el grupo C57BL/6 (**Figura 6B**). Las diferencias entre las dos diluciones podrían radicar en que estos autoanticuerpos están en concentraciones bajas por lo que no son detectados a diluciones altas.

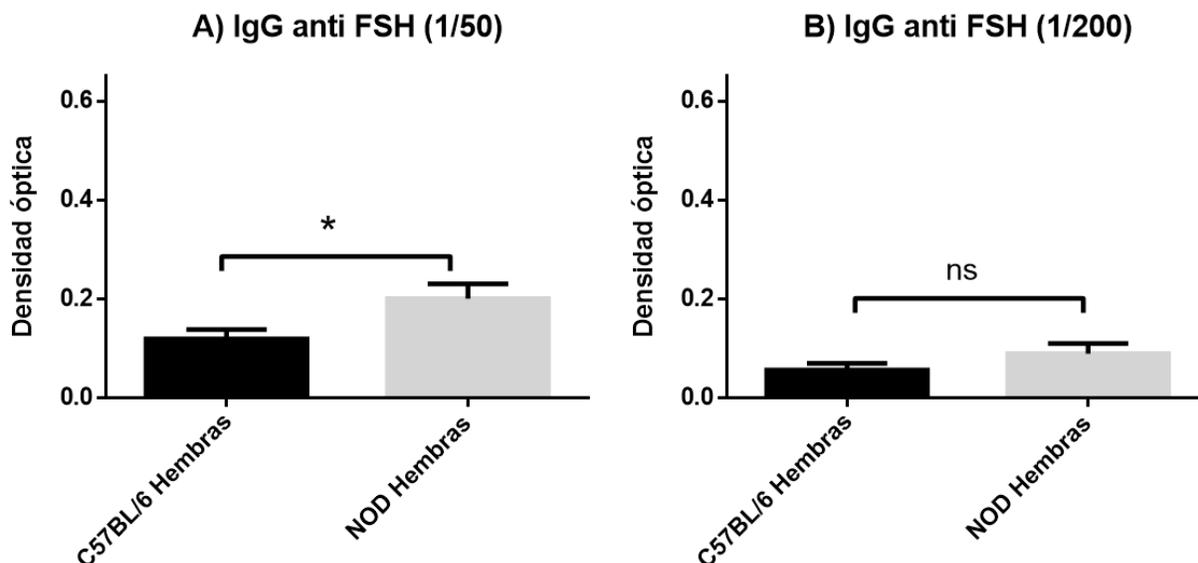


Figura 6: Respuesta humoral específica para antígeno FSH en ratones hembras. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** C57BL/6 Hembras y NOD Hembras, dilución 1/50 (N = 6, P = 0,04). **B)** C57BL/6 Hembras y NOD Hembras, dilución 1/200 (N = 6, P = 0,19).

Tras corroborar la presencia de autoanticuerpos específicos para FSH en NOD, se continuó el estudio comparando grupos de ratones hembras NOD, bajo tratamiento EAC y control. En las lecturas de absorbancia a 450nm no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**Figura 7**).

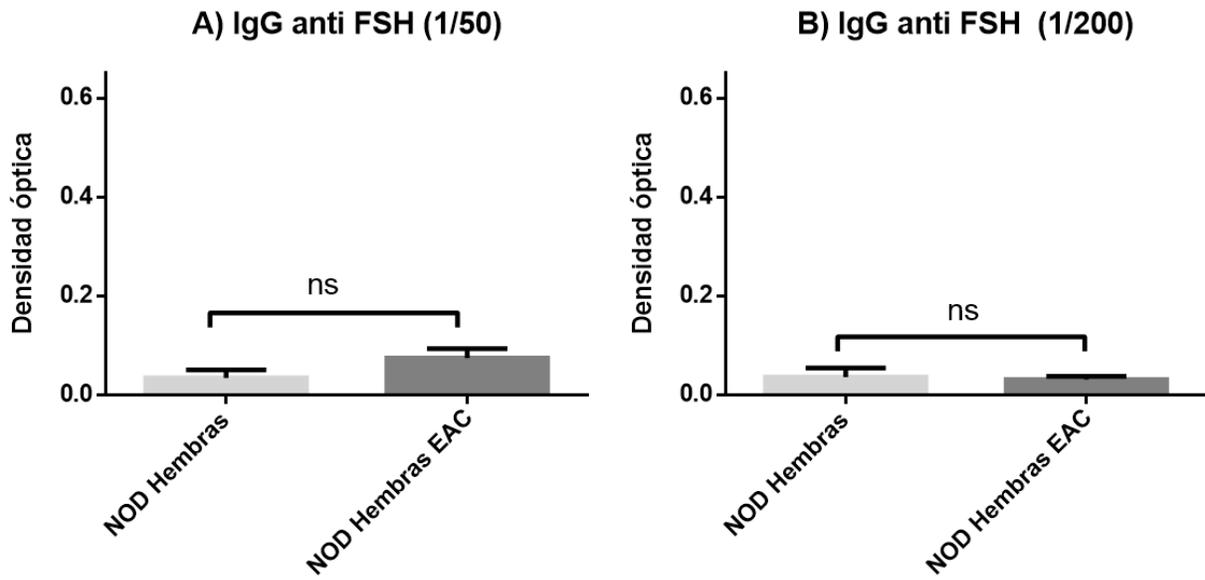


Figura 7: Respuesta humoral específica para antígeno FSH en ratones hembras NOD. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** NOD Hembras y NOD hembras EAC, dilución 1/50 (N = 7, P = 0,23). **B)** NOD hembras y NOD Hembras EAC, dilución 1/200 (N = 7, P = 0,79).

Por último, en el análisis de la respuesta humoral específica para el antígeno LH, se contrastaron los grupos C57BL/6 y NOD obteniéndose una tendencia en ambas diluciones trabajadas donde la media de las lecturas de las absorbancias a 450nm es mayor en el grupo NOD que en el C57BL/6 (**Figura 8**).

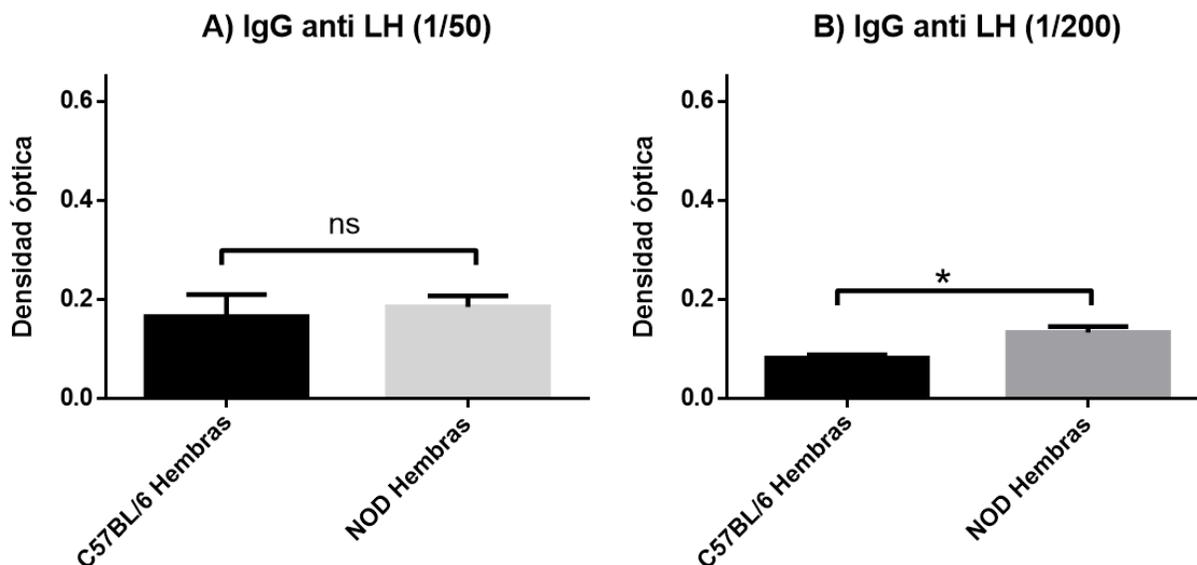


Figura 8: Respuesta humoral específica para antígeno LH en ratones hembras. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** C57BL/6 Hembras y NOD Hembras, dilución 1/50 (N = 6, P = 0,75). **B)** C57BL/6 Hembras y NOD Hembras, dilución 1/200 (N = 5, P = 0,005).

Luego del análisis de la presencia de autoanticuerpos específicos para LH en los grupos C57BL/6 y NOD, se procedió a comparar los grupos de ratones hembras NOD, controles y tratados con EAC (**Figura 9**). Como se puede observar en la figura 9, no se observaron diferencias significativas en los niveles de autoanticuerpos para LH en ambas diluciones.

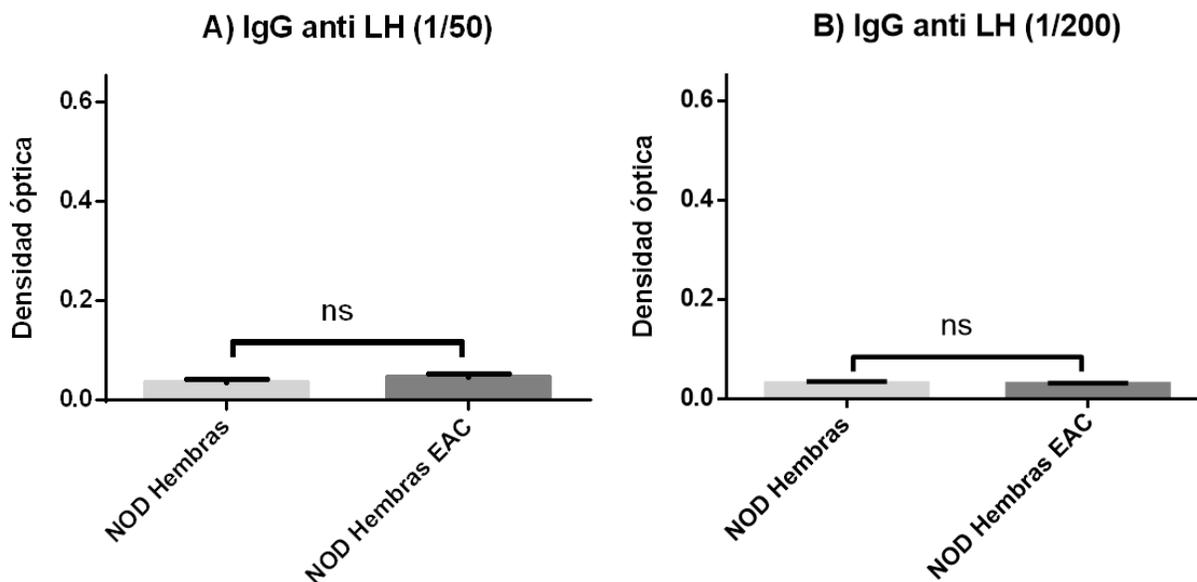


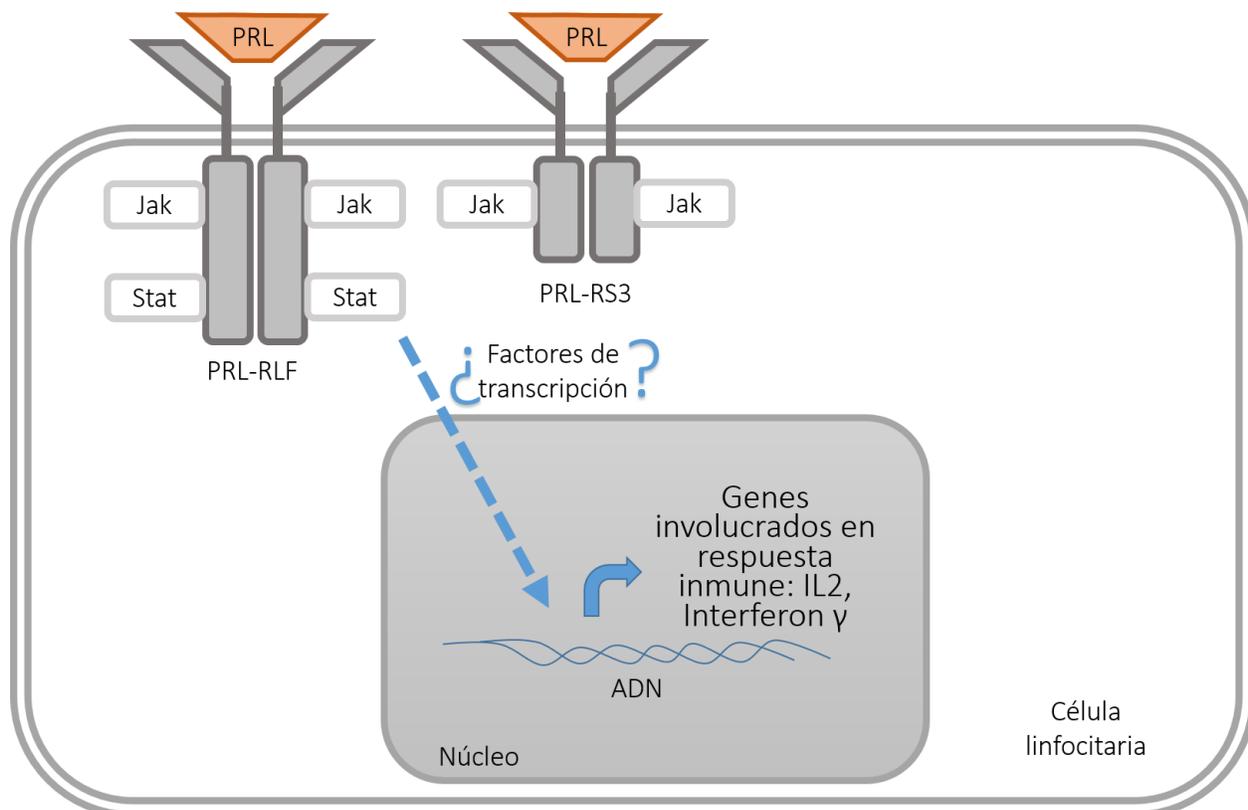
Figura 9: Respuesta humoral específica para antígeno LH en ratones hembras NOD. Se realizaron pruebas T de Student en los grupos comparados. **A)** NOD Hembras y NOD Hembras EAC, dilución 1/50 (N = 7, P = 0,37). **B)** NOD Hembras y NOD Hembras EAC, dilución 1/200 (N = 7, P = 0,81).

7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis, utilizando cultivos primarios de esplenocitos estudiamos la expresión de ARNm de la isoforma larga y la isoforma corta 3 del receptor de prolactina. Hemos identificado por primera vez la isoforma corta 3 del receptor de prolactina (PRL-RS3) en esplenocitos de ratón. Además hemos demostrado en forma semicuantitativa que el PRL-RS3 aumenta diferencialmente durante la activación celular. También utilizando muestras de ratones NOD adultos determinamos la presencia de autoanticuerpos contra prolactina y FSH.

Al presente, se postula que PRL, mediante la unión a PRL-RLF disminuye el umbral de activación de células del sistema inmune, promoviendo la proliferación de las mismas (12). Sin embargo, las condiciones donde se inducen estados hiperprolactinémicos podrían no reflejar condiciones fisiológicas de activación y selección clonal. Debido a los motivos expresados anteriormente, en el presente trabajo de tesis hemos utilizado cultivos primarios de esplenocitos estimulados policlonalmente con concanavalina A para simular una activación celular. De esta manera se evalúa la sensibilidad a PRL durante la activación linfocitaria. Nuestros resultados demuestran que esplenocitos expresan PRL-RS3 y PRL-RLF. Aunque PRL-RS3 es incapaz de activar el factor de transcripción principal de la activación inducida por PRL, STAT5b, retiene los sitios de activación de JAK y MAPK (15). Debido a estos antecedentes, la inducción de la expresión de PRL-RS3 en leucocitos podría tener un efecto inhibitorio directo en moléculas moduladas por STAT5b como por ejemplo citoquinas involucradas en el perfil T colaborador 1 (Th) y Th2 (38). Por otro lado, la inducción de PRL-RS3 no tendría grandes implicancias en la respuesta mediada por las vías de activación dependientes de JAK, AKT y MAPK cuando se expresa en conjunto con PRL-RLF. Esto es debido a que ambas isoformas presentan los mismos sitios de unión al ligando como así también para estas moléculas adaptadoras involucradas en las activación de JAK, AKT y MAPK. El aumento de la expresión de ARNm del PRL-RS3 que hemos evidenciado en respuesta a la activación celular estaría de acuerdo a lo observado por Belugin y *col*, en neuronas donde la activación y señalamiento

vía PRL-RS produce un activación celular transitoria (39). Estos datos sugieren que durante la activación linfocitaria, el aumento de la expresión del PRL-RS3 estaría autorregulando la sensibilidad celular a PRL principalmente de las moléculas moduladas por STAT5b.



Nuestros resultados demuestran que esplenocitos expresan PRL-RS3 y PRL-RLF. Aunque PRL-RS3 es incapaz de activar el factor de transcripción principal de la activación inducida por PRL, STAT5, podría tener un efecto inhibitorio directo en los factores de la respuesta inmune modulados por STAT5 como por ejemplo citoquinas involucradas en el perfil T colaborador 1.

De forma contraria a lo esperado no observamos modificaciones en la expresión del PRL-RLF en presencia de activación celular. Todos estos datos sugieren que la sensibilidad a PRL durante la activación, estarían dados principalmente por la modulación del PRL-RS3 teniendo un gran impacto en la inhibición o activación de los genes dependientes y modulados por STAT5b. Sin

embargo, queda por evaluar la expresión de las restantes isoformas cortas del receptor de PRL dado que los protocolos para lograr la amplificación de ADNc correspondiente a ARNm de las isoformas cortas 1 y 2 (PRL-RS1 y PRL-RS2) no lograron ser ajustados para obtener los productos deseados en el tiempo de trabajo.

Los resultados de los ensayos de ELISA sobre la presencia de autoanticuerpos específicos para PRL en ratones NOD machos y hembras sugieren que PRL es un antígeno blanco en esta cepa de ratones. Estos hallazgos son de gran importancia fisiológica, ya que estos autoanticuerpos podrían afectar la función hipofisaria y reproductiva. Estos datos están de acuerdo a lo observado por otros investigadores respecto a la presencia de autorreactividad frente a glándulas, siendo la hipófisis una glándula del sistema neuro-endócrino (40). Teniendo en cuenta que la autoinmunidad en modelos de animales, como así también en la especie humana, se presenta en una relación 10 a 1 (femenino/masculino), la presencia de altos niveles de autoanticuerpos contra PRL en ratones machos fortalece la idea de que PRL se comporta como un autoantígeno inmuno-dominante. Lamentablemente durante el tiempo de realización de este trabajo no se pudo disponer de ratones machos C57BL/6 de edad avanzada para ser utilizados como controles. Debido a esto se utilizó como grupo control de la cepa NOD (hembras y machos), ratones hembras C57BL/6.

La identificación de la presencia de autoanticuerpos contra FSH en ratones NOD hembras estaría de acuerdo a la disminución de la fertilidad en

nuestro plantel de animales NOD, ya que FSH cumple un rol crucial en la foliculogénesis del ovario (41). De forma contraria a lo observado para FSH, no logramos encontrar autoanticuerpos contra LH. Igualmente, aunque a una dilución 1/200 los sueros NOD presentan diferencia respecto a los controles, la ausencia de diferencia significativa usando suero más concentrado podría indicar que esta metodología podría no ser la correcta para determinar la presencia de autoanticuerpos específicos para LH.

De forma contraria a lo observado por Durant *et al* en el que el EAC induce un aumento en los procesos autoinmunitarios, nuestros datos sugieren que el estrés no sería un factor significativo en el desarrollo de respuesta autorreactiva contra PRL, FSH y LH (42).

En síntesis, este cuerpo de conocimiento contiene la primera descripción de células del sistema inmune expresando en forma diferencial isoformas del receptor de prolactina PRL-RS3 y PRL-RLF. Además, hemos observado que ratones NOD presentan autoanticuerpos contra PRL y FSH. Estos datos ayudarán a la comprensión de la modulación del sistema inmune como así también los mecanismos patogénicos presentes. Así mismo, también podrían, en un futuro, colaborar con el desarrollo de inmunoterapias basadas en la modulación y sensibilidad a PRL por el sistema inmune. Adicionalmente este trabajo podría colaborar con la identificación de nuevos autoantígenos hipofisarios en patologías autoinmunes y su relación con una disminución en la fertilidad.

8 REFERENCIAS

1. T. P. Janeway CA Jr, Walport M, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*, (Garland Science, New York, ed. 5th, 2001).
2. J. P. Mackern-Oberti *et al.*, *Autoimmun Rev* **14**, 127 (2015).
3. I. K. Gratz *et al.*, *J Immunol* **192**, 1351 (2014).
4. B. Oftedal *et al.*, *Immunity* **42**, 1185 (2015).
5. B. H. Hahn, *N Eng J Med* **368**, 1528 (2013).
6. J. Suurmond, Y. R. Zou, S. J. Kim, B. Diamond, *Sci Transl Med* **7**, 280 (2015).
7. F. Houssiau, E. Ginzler, *Lupus* **17**, 426 (May 1, 2008, 2008).
8. B. B. Ganesh, P. Bhattacharya, A. Gopisetty, B. S. Prabhakar, *J Interferon Cytokine Res* **31**, 721 (2011).
9. Y. Tomer, A. Huber, *J Autoimmun* **32**, 231 (2009).
10. W. J. Martin *et al.*, *Autoimmun Rev* **14**, 710 (2015).
11. M. Østensen *et al.*, *Autoimmun Rev* **14**, 376 (2015).
12. C. Bole-Feysot, V. Goffin, M. Edery, N. Binart, P. A. Kelly, *Endocr Rev* **19**, 225 (1998).
13. R. Dagil *et al.*, *Structure* **20**, 270 (2012).
14. D. Xu, L. Lin, X. Lin, Z. Huang, Z. Lei, *Cell Immunol* **263**, 71 (2010).
15. Z.-Z. Hu, J. Meng, M. L. Dufau, *J Biol Chem* **276**, 41086 (2001).
16. V. Goffin, J. A. Martial, N. L. Summers, *Protein Eng* **8**, 1215 (1995).

17. J. W. Schmidt *et al.*, *Mol Cell Biol* **34**, 1363 (2014).
18. A. M. Qazi, C.-H. Tsai-Morris, M. L. Dufau, *Mol Endocrinol* **20**, 1912 (2006).
19. J. B. Kline, C. V. Clevenger, *J Biol Chem* **276**, 24760 (2001).
20. D. L. Clarke, B. J. Arey, D. I. Linzer, *Endocrinology* **133**, 2594 (1993).
21. M. Nagano, P. A. Kelly, *J Biol Chem* **269**, 13337 (1994).
22. Y. Sangeeta Devi, J. Halperin, *Mol Cell Endocrinol* **382**, 400 (2014).
23. V. Moulton, G. Tsokos, *J Clin Invest* **125**, 2220 (2015).
24. S. R. Dube *et al.*, *Psychosom Med* **71**, 243 (2009).
25. WHO, *WHO Bulletin*, (2013).
26. E. Roussou, C. Iacovou, A. Weerakoon, K. Ahmed, *Rheumatol Int* **33**, 1367 (2013/05/01, 2013).
27. M. Cutolo, R. H. Straub, *Neuroimmunomodulation* **13**, 277 (2006).
28. A. Sepa, J. Wahlberg, O. Vaarala, A. Frodi, J. Ludvigsson, *Diabetes Care* **28**, 290 (2005).
29. N. Deckx, W.-P. Lee, Z. N. Berneman, N. Cools, *Clinical and Developmental Immunology* **2013**, 23 (2013).
30. J. L. Abelson, S. Khan, N. Giardino, *Biological Psychology* **84**, 57 (2010).
31. J. Zha, A. Smith, S. Andreansky, V. Bracchi-Ricard, J. R. Bethea, *Journal of Neuroinflammation* **11**, 65 (2014).
32. F. S. Dhabhar, *Annals of the New York Academy of Sciences* **917**, 876 (2000).
33. N. Hattori *et al.*, *Clin Endocrinol* **68**, 72 (2008).

34. E. O. Johnson, P. G. Vlachoyiannopoulos, F. N. Skopouli, A. G. Tzioufas, H. M. Moutsopoulos, *J Rheumatol* **25**, 1508 (1998).
35. J. M. Schaefer *et al.*, *Psychoneuroendocrinology* **38**, 3039 (2013).
36. M. Mariani, D. Ciocca, A. Gonzalez Jatuff, M. Souto, *Reproduction* **126**, 801 (December 1, 2003, 2003).
37. JacksonLaboratory. (2017).
38. D. L. Owen, M. A. Farrar, *F1000Research* **6**, 32 (2017).
39. S. Belugin *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **288**, 34943 (November 29, 2013, 2013).
40. H. Braley-Mullen, S. Yu, *Adv Immunol* **126**, 1 (2015).
41. Y. Lin *et al.*, *Reproduction* **137**, 943 (2009).
42. S. Durant *et al.*, *J Autoimmun* **6**, 735 (1993).