

**Efectos de la Paratohormona y su receptor en linfocitos B de pacientes con
Lupus Eritematoso Sistémico y Síndrome de Sjögren: ¿Un nuevo mecanismo
hormonal en el desarrollo de autoinmunidad?**

Lady Johana Ríos Serna

Universidad del Valle

Facultad de Salud. Escuela de Ciencias Básicas

Santiago de Cali

2022

**Efectos de la Paratohormona y su receptor en linfocitos B de pacientes con
Lupus Eritematoso Sistémico y Síndrome de Sjögren: ¿Un nuevo mecanismo
hormonal en el desarrollo de autoinmunidad?**

Lady Johana Ríos Serna

Trabajo de Investigación para optar al título de
Magíster en Ciencias Biomédicas

Tutor.

Gabriel Jaime Tobón, MD, PhD

Centro de Investigación de Medicina Traslacional en Reumatología y
Autoinmunidad (CIRAT), Universidad Icesi

Cotutora.

Anilza Bonelo Perdomo, Bsc, Msc, PhD

Grupo de Investigación Virus Emergentes y Enfermedad (VIREM)

Universidad del Valle

Facultad de Salud. Escuela de Ciencias Básicas

Santiago de Cali

2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Ciudad y fecha (DD/MM/AAAA)

Dedicatoria

Nacemos, crecemos y aprendemos a caminar.

*Toman nuestras manos, tomamos manos, soltamos manos, seguimos caminos,
construimos caminos, construimos ideas y nos brotan alas, luego aprendemos a
volar y a soñar.*

*Nuestros pasos son decisiones, a veces acelerados y otras veces con la
precaución de quien fuese a caer por un acantilado.*

*Decidimos avanzar, por nuestra propia convicción y alcanzamos nuestros sueños
con determinación, dedicación, disciplina y esfuerzo.*

Creer en la utopía es de soñadoras, pero vivirla, es de valientes e inconformes.

*Como lo es para quien decide investigar lo inexplorado, para quien abre el
horizonte de lo desconocido, para quien no está satisfecho con lo posible y se
dedica a lo impensable.*

*Para aquellas que, como yo, valientes, inconformes y soñadoras, decidieron mirar
a través de la cerradura de la naturaleza y tratan de descubrir lo que sucede.*

A todas las mujeres que hacen parte de mi vida, que han sido pilares y luz en mi camino. A mi madre por confiar siempre en mí y arriesgarse para que yo pudiera construir mi propio futuro -aquí estoy entregándote un logro más-. A mi hermana por ocuparse de mí con tanto amor y enseñarme que la dedicación siempre alcanza el talento. A mi compañera de vida, por ser mi soporte y permanecer con tanto amor a mi lado. Al círculo sagrado de mujeres por no dejar que olvide que siempre hay otras formas, otros conocimientos y que, construir siempre será mejor juntas.

Agradecimientos

Agradezco a mis tutores, el Dr Gabriel Tobón y la Dra Anilza Bonelo Perdomo, por confiar en mi proceso, por su acompañamiento y guía académica, por alimentar mi conocimiento y pasión por la inmunología. Gracias especiales al Dr Tobón, por escuchar siempre con atención y respeto, desde que era estudiante de pregrado y aún hoy 5 años después, por cultivar la confianza y autonomía en mi proceso de aprendizaje y desarrollo profesional.

A mis compañeras de trabajo, Jessica, María Claudia, Ingrid, Valeria, por sus aportes y acompañamiento en el proceso, especialmente a Ivana Nieto por su apoyo en el reclutamiento de los pacientes y la construcción de la base de datos. A mis jóvenes talento, Diana Cárdenas y Angie Rosero, por su valioso apoyo en la ejecución experimental y por compartir conmigo todas las emociones del proceso de investigación.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación-Minciencias, Colombia (antes Colciencias), que por medio de la Convocatoria 807-2018 para proyectos de ciencia, tecnología e innovación en salud en 2018 (CT. 835-2018) financió el proyecto “Receptor de la Paratohormona (PTH1R) y paratohormona como biomarcadores de diagnóstico temprano y de actividad en enfermedades autoinmunes sistémicas (Lupus Eritematoso Sistémico y Síndrome de Sjögren)” dentro del cual se desarrolló este trabajo de grado.

Finalmente, un sincero agradecimiento a la Universidad Icesi y al Centro de investigación CIRAT, por el apoyo económico y de tiempo, para llevar a cabo mis estudios y seguir creciendo profesionalmente, y a la Universidad del Valle, por los convenios y colaboraciones interinstitucionales que facilitan la culminación exitosa de este proceso.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Diseño de la investigación	26
Población de estudio	26
Aspectos éticos	27
Células y líneas celulares	28
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.	28
Crecimiento y mantenimiento de líneas celulares.	28
Condiciones de estimulación <i>in vitro</i>	28
Citometría de flujo	29
Expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones.	29
Subpoblaciones en línea celular.	31
Ensayo de apoptosis en línea celular.	33

Proliferación celular en línea celular.....	33
Cuantificación de inmunoglobulinas (ELISA)	34
Detección de proteínas fosforiladas (Inmunoblot)	34
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
Caracterización de participantes.....	37
Expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones.....	37
Efecto de la estimulación con PTH sobre la distribución de las subpoblaciones en linfocitos B.....	39
Efecto de la estimulación con PTH en la supervivencia de los linfocitos B	41
Efecto de la estimulación con PTH en la proliferación de los linfocitos B..	42
Efecto de la estimulación con PTH en la producción de inmunoglobulinas	43
Efecto de la estimulación con PTH en la activación intracelular del linfocito B	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	54
LIMITACIONES	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS.....	66
Anexo 1. Distribución de subpoblaciones celulares en las cohortes.....	66
Anexo 2. Caracterización celular de línea Ramos (RA1)	67
Anexo 3. Efecto aislado de la PTH en la activación del linfocito B	68

Anexo 4. Aceptación de abstract en presentación oral Congreso Internacional de Lupus y Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA) 2021	69
Anexo 5. Carta de reconocimiento “Top 5 CORA 2021”	70
Anexo 6. Publicación en revista científica.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución global de enfermedades autoinmunes.....	18
Tabla 2. Autoantígenos en enfermedades autoinmunes órgano específicas y no órgano específicas.....	19
Tabla 3. Anticuerpos primarios para detección de proteínas en Inmunoblot.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia de análisis de expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones.....	31
Figura 2. Estrategia de análisis de subpoblaciones en línea celular Ramos (RA1).....	32
Figura 3. Estrategia de análisis de apoptosis en línea celular Ramos (RA1).....	33
Figura 4. Expresión de PTH1R en Linfocitos B.....	38
Figura 5. Distribución de subpoblaciones de linfocitos B PTH1R ⁺	39
Figura 6. Cambios fenotípicos de los linfocitos B estimulados con PTH	40-41
Figura 7. Sobrevida de los linfocitos B estimulados con PTH.....	42
Figura 8. Proliferación celular de linfocitos B estimulados con PTH.....	43
Figura 9. Cuantificación de IgM en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos B estimulados con PTH.....	44
Figura 10. Efectos de la PTH en la señalización intracelular en linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1).....	45
Figura 11. Representación del linfocito B en el centro germinal.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

7AAD	7 aminoactinomicina D
ANOVA	Análisis de varianza
APC-A700	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
BCA	Ácido bicinconínico
BCR	Receptor del linfocito B
CASR	Receptor de calcio sérico
CD	Cluster de diferenciación
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CpG	Citosina y guanina unidas por un fosfato
dsDNA	DNA de doble cadena
EAs	Enfermedades Autoinmunes
ECL	Enhanced luminol-based chemiluminescent
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESSDAI	EULAR Sjogren's syndrome disease activity index
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward scatter (Detector de tamaño)
HC	Controles sanos
HRP	Peroxidasa de rábano
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IQR	Rango Intercuartílico
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MNSP	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina

PECy7	Ficoeritrina-Cianina 7
PI	Ioduro de propidio
PTH1R	Receptor 1 de la paratohormona
PTH	Paratohormona
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
RPMI	Medio del instituto Roswell Park Memorial
SBF	Suero Fetal Bovino
SHM	Hipermutación somática
SLEDAI	Systemic lupus erythematosus disease activity index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Side scatter (Detector de complejidad)
SSp	Síndrome de Sjögren primario

RESUMEN

La etiología y patogénesis de las Enfermedades Autoinmunes (EAs) son multifactoriales y complejas, en las cuales, diversos factores, incluyendo componentes genéticos, epigenéticos, ambientales y hormonales han sido relacionados con el inicio y progresión de dichas patologías. Dentro de los factores hormonales, los estrógenos, la prolactina y la testosterona han sido ampliamente estudiados.

Por otra parte, altos niveles de la Paratohormona (PTH) en pacientes con hiperparatiroidismo primario, han sido asociados clínicamente con el desarrollo de algunas EAs. Dado que el impacto fisiopatológico de la PTH sobre el sistema inmune y el desarrollo de EAs no se ha dilucidado por completo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del receptor de PTH (PTH1R) en los linfocitos B de pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp) y LES, y los efectos de la PTH en células B *in vitro*, con el fin de aportar en el entendimiento de los mecanismos hormonales como potenciales disparadores de autoinmunidad.

En este estudio se evaluó la expresión diferencial del PTH1R en los linfocitos B obtenidos de sangre periférica de pacientes con LES (n=14), SSp (n=20) y controles sanos (HC, n=20) y la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B maduros (Bm1-Bm5) que expresan el PTH1R, mediante análisis de citometría de flujo. Así mismo, se analizó la posible correlación entre la expresión del PTH1R y los índices de actividad clínicos de LES (SLEDAI) y el SSp (ESSDAI).

Con el fin de determinar los efectos biológicos de la PTH sobre los linfocitos B, se realizaron análisis de proliferación, apoptosis, distribución de las subpoblaciones de linfocitos B, producción de inmunoglobulinas y vías de activación, luego de la estimulación por PTH sobre una línea celular de linfocitos B (Ramos).

Al analizar la expresión del PTH1R en los linfocitos B, se encontró que los pacientes con LES expresaron mayor porcentaje de este receptor sobre su membrana (14.5%), comparado con los pacientes con SSp (4.6%), **$p=0.007$** ; y HC (5%), **$p=0.003$** .

Por otra parte, la distribución de las subpoblaciones que expresan PTH1R varió entre las cohortes. En pacientes con SSp, la expresión del PTH1R fue significativamente menor en la subpoblación Bm1 (20.2%) y mayor en la Bm2 (30.5%) y Bm2' (8.7%) mientras que en los HC fue de 39%, 18%, 1,7%; respectivamente (**$p=0.010$, **0.05**, **0.028**, respectivamente**). Adicionalmente, los pacientes con SSp que presentaron mayores niveles de PTH1R, tuvieron correlación con la actividad clínica determinada por ESSDAI ($r=0.511$, **$p=0.026$**). Estos hallazgos no se detectaron en pacientes con LES.

En el análisis *in vitro*, las concentraciones más altas de PTH mantuvieron los linfocitos B en el fenotipo Bm3-4 durante 48 horas en el cultivo, en comparación con los linfocitos B no estimulados que se diferenciaron al fenotipo eBm5, **$p=0.03$** . No se observaron efectos *in vitro* sobre la proliferación, la apoptosis, la producción de inmunoglobulinas o activación celular.

Estos resultados permiten concluir que la expresión del receptor PTH1R podría ser un biomarcador útil en LES y un marcador de actividad en SSp. Los efectos de la PTH sobre la modulación de las subpoblaciones de linfocitos B sugieren un papel potencial de la hormona en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

Estudios *in vivo*, en modelos animales de autoinmunidad pudieran ayudar en el entendimiento de la PTH sobre el sistema inmune.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades autoinmunes, Receptor de Hormona Paratiroidea Tipo 1, Biomarcadores, Hiperparatiroidismo primario, Paratohormona, Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Sjögren, linfocitos B.

ABSTRACT

The etiology and pathogenesis of Autoimmune Diseases (ADs) are multifactorial and complex, where many factors, including genetic, epigenetic, environmental, and hormonal, are associated to the onset and progression of these pathologies. The role of several hormones in the development of ADs, including estrogens, prolactin and testosterone has been widely described.

On the other hand, high levels of Parathormone (PTH) in patients with primary hyperparathyroidism have been clinically associated with the development of some ADs. However, the pathophysiological impact of PTH on the immune system and the development of ADs has not been fully elucidated. The aim of this study was to evaluate the expression of the PTH receptor (PTH1R) on B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and SLE, and the effects of PTH on B cells *in vitro*, to contribute to the knowledge of hormonal mechanisms as potential triggers of autoimmunity.

Firstly, the differential expression of PTH1R on B-lymphocytes from peripheral blood of patients with SLE (n=14), pSS (n=20) and healthy controls (HC, n=20), and the distribution of mature B-lymphocytes subsets (Bm1-Bm5) expressing PTH1R, by flow cytometry analysis was evaluated. Moreover, the possible correlation between the expression of PTH1R and the clinical activity index of SLE (SLEDAI) and pSS (ESSDAI) was analyzed.

Secondly, to determine the biological effects of PTH on B-lymphocytes, analyzes of proliferation, apoptosis, distribution of B lymphocyte subsets, immunoglobulin production, and activation pathways, were performed after stimulation by PTH on a cell line of B lymphocytes (Ramos).

The expression of PTH1R on B-lymphocytes was expressed in a higher percentage in patients with SLE (14.5%), compared to pSS (4.6%), ***p=0.007***; and HC (5%), ***p=0.003***.

Furthermore, the distribution of subsets expressing PTH1R was different between cohorts. In patients with pSS, PTH1R expression was significantly lower in Bm1 subset (20.2%) and higher in Bm2 (30.5%) and Bm2' (8.7%), while in HC it was 39 %, 18%, 1.7%; respectively (***p=0.010, 0.05, 0.028***, respectively). Moreover, patients with pSS with high levels of PTH1R, had a correlation with the clinical activity determined by ESSDAI ($r=0.511$, ***p=0.026***). These findings were not detected in patients with SLE.

In vitro analysis showed that higher concentrations of PTH maintained B cells in the Bm3-4 subsets for 48 hours in cell culture, compared to unstimulated B cells that differentiated to eBm5 subset, ***p=0.03***. No *in vitro* effects on cell proliferation, apoptosis, immunoglobulin production or activation were observed.

These results let to conclude that the expression of the PTH1R receptor could be a useful biomarker in SLE and an activity marker in pSS. The PTH effects on the modulation of B-lymphocyte subsets suggest a potential role to the hormone in the pathophysiology of autoimmune diseases.

In vivo studies in animal models of autoimmunity could help in the understanding of PTH on the immune system.

KEYWORDS: Autoimmune diseases, Type 1 Parathyroid Hormone Receptor, Biomarkers, Primary Hyperparathyroidism, Parathormone, Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren´s Syndrome, B lymphocyte.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está conformado por órganos, células y diversas moléculas que actúan en conjunto y de forma coordinada para responder y defender ante agentes patógenos o moléculas reconocidas como extrañas. Sin embargo, existen situaciones en las que esta respuesta no es efectiva o produce daños al organismo. En el primero de los casos, se presenta una incapacidad del sistema o de alguno de sus componentes para responder ante patógenos, generando un estado de inmunodeficiencia. En el segundo caso, existe una pérdida de la capacidad de distinguir entre lo propio y lo no propio (tolerancia), de esta manera, el sistema inmune ataca el(los) tejido(s) generando daño, y es la base del concepto de las enfermedades autoinmunes (EAs) (1).

Las EAs son complejas y multifactoriales, afectan aproximadamente a un 5-7% de la población mundial desarrollada, siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad (2). En conjunto, representan una diversidad de enfermedades en términos de su distribución demográfica y las manifestaciones clínicas, por lo que los estudios de prevalencia e incidencia muestran datos variables en diferentes regiones geográficas y poblaciones. Shapira Y., y col. (2) presentan una recopilación de datos epidemiológicos de estudios que se han llevado a cabo en varios países y grupos étnicos y geográficos, donde describen la distribución global de algunas enfermedades autoinmunes importantes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Distribución global de enfermedades autoinmunes

Enfermedad	Prevalencia por cada 100.000 habitantes										
	América del Norte	América Central/Caribe	América del Sur	Norte de Europa	Sur de Europa	Oeste de Europa	Este de Europa	Medio Oriente	Asia	África	Oceanía
Diabetes tipo 1	150-230	<20 /100-200	50-150	200-700	150-250	150-200	30-140	40-200	<70	<100	400
Esclerosis Múltiple	90-120	<20	<20	50-200	30-100	60-120	20-80	20-60	<5	<20	60-100
Enfermedad de Graves	500-1120	ND	ND	600-1200	ND	ND	ND	ND	1200	ND	ND
Enfermedad de Hashimoto	300-550	ND	ND	3000-5000	ND	ND	ND	ND	ND	Rara	-
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	150-300	102	60-250	20-120	ND	ND	ND	55-70	3-40	ND	ND
Lupus Eritematoso Sistémico(77)	48-366	50-60	24.3-126.3	29.3-210	30-70	40	ND	ND	20.6-103	600-7713	ND
Síndrome de Sjögren	229.6	ND	17.4	rara	ND	ND	ND	ND	2.4	ND	rara

Tomado y modificado de Y. Shapira et al. / Journal of Autoimmunity 34 (2010)

De manera general, y según sus manifestaciones, las EAs pueden clasificarse como órgano específicas, en donde existe una respuesta contra un antígeno o antígenos limitados a un órgano diana o un tipo de tejido específico. Por otro lado, en las EAs no órgano específicas o sistémicas, la respuesta inmune o los mecanismos de daño están dirigidos contra antígenos distribuidos ampliamente en el cuerpo (3). En la **Tabla 2** se observan algunos ejemplos de EAs órgano específicas y no órgano específicas con los autoantígenos diana conocidos (4,5).

Tabla 2. Autoantígenos en enfermedades autoinmunes órgano específicas y no órgano específicas.

Enfermedad autoinmune	Autoantígeno diana
EAs órgano específicas	
Esclerosis Múltiple	Proteína básica de Mielina
Enfermedad de Graves	Receptor de la TSH
Diabetes tipo I	Insulina, GAD-65, IA-2
Miastenia grave	Receptor de acetilcolina
EAs no órgano específicas	
Lupus Eritematoso Sistémico	dsDNA, Sm, U1RNP, Ro/SS-A, Histona, Cardiolipina, Nucleosoma
Artritis Reumatoide	Factor reumatoideo, Péptido citrulinado
Síndrome de Sjögren	Ro/SS-A, La/SS-B

EAs: Enfermedades autoinmunes, TSH: Hormona estimulante de tiroides, GAD: Glutamato decarboxilasa, dsDNA: DNA doble cadena, Sm: Smith, U1RNP: ribonucleoproteína U1

Dos de las EAs sistémicas más importantes en términos de prevalencia y compromiso tisular, son el LES y el SSp, ejemplos característicos de EAs mediadas por hiperactividad de los linfocitos B (autoanticuerpos, producción de citoquinas, generación de complejos inmunes). Ambas son enfermedades crónicas y comparten algunas manifestaciones clínicas y afecciones orgánicas, como fiebre,

fatiga, fotosensibilidad, fenómeno de Raynaud, artralgia, neuropatía periférica, adenomegalias, entre otras, variando en ambas enfermedades las frecuencias de presentación (6). Tanto el LES como el SSp afectan principalmente a mujeres (distribución F:M, 9:1), en el caso del LES, mujeres en edad reproductiva, mientras que en el SSp se observa una mayor incidencia en mujeres entre los 40-60 años. El LES se caracteriza principalmente por la producción de autoanticuerpos, tales como los anti-DNA de doble cadena (anti-dsDNA) y los anti-Sm, los cuales son específicos en el diagnóstico de la patología (7), y la formación y depósito de complejos inmunes que afectan una amplia gama de órganos, siendo los compromisos renal y neurológico, dos de los más graves y asociados con morbi-mortalidad. En el SSp se presenta una disfunción de las glándulas exocrinas, llevando a una sequedad de las principales superficies de las mucosas, principalmente en ojos y boca, siendo la xerostomía (sensación de sequedad oral) y la xeroftalmía (sequedad de la conjuntiva), factores clave en el diagnóstico de la enfermedad, ya que se presenta en más del 95% de los pacientes (7,8).

El origen o la causa del desarrollo del LES y SSp no ha sido completamente dilucidada, sin embargo, se ha establecido que la patogénesis de estas enfermedades comprende una compleja interacción entre varios factores, incluyendo los factores genéticos, epigenéticos, ambientales, hormonales, exposición a medicamentos, y alteraciones en el sistema inmunológico (9). Esta compleja interacción entre el sistema inmune y los diferentes estímulos que influyen en sus mecanismos de control se conoce como el **“mosaico de la autoinmunidad”**.

Los factores genéticos establecen un estado de susceptibilidad que por sí sola no genera una patología (exceptuando algunos casos de autoinmunidad monogénica), que finalmente asociada a los factores ambientales, hormonales, infecciones u otros factores externos pueden resultar en la pérdida de la tolerancia a lo propio, favoreciendo el desarrollo de la patología autoinmune. Adicionalmente estos

factores pueden ser activadores o desencadenantes de la sintomatología como resultados de procesos inflamatorios y de daño tisular.

Enfocados en el papel de uno de estos componentes del llamado “mosaico de la autoinmunidad” encontramos el efecto de diferentes hormonas. El papel de las hormonas en el desarrollo de las EAs deriva de la interacción entre el sistema inmune y el neuroendocrino, conocido como el eje Neuro-Inmuno-Endocrino (10). El Sistema Nervioso Central (SNC) puede comunicarse con el sistema inmunológico para modular su actividad, a través de diferentes vías: sistema nervioso autónomo, vía catecolaminérgica, neuropéptidos, y la liberación de hormonas estimulantes (11). Por su parte, se ha descrito que células del sistema inmune producen numerosas hormonas, las almacenan y las secretan, y adicionalmente, cuentan con receptores para las hormonas y vías de transducción de señales que sugieren un efecto sobre estas células (12).

La función de varias hormonas en el sistema inmune, y sus posibles implicaciones en el desarrollo de la autoinmunidad han sido ampliamente descritos, entre ellas el papel de hormonas como los estrógenos (13), la prolactina (14), la leptina y las hormonas tiroideas tienen efectos inflamatorios en la respuesta inmune (15,16). Por otra parte, el cortisol (17), los estrógenos a bajas concentraciones, los andrógenos, la progesterona y algunas condiciones particulares de las hormonas tiroideas, tienen efectos moduladores antiinflamatorios (13,16). En este contexto, los efectos de otra importante hormona, la PTH, sobre la función en el sistema inmune no han sido completamente dilucidados.

La PTH es una hormona de 84 aminoácidos en su forma activa (18), es codificada por el gen PTH que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11 y presenta una longitud de aproximadamente 4,1kbp (19) y se encarga principalmente de regular la homeostasis del calcio. Esta hormona es sintetizada al interior de las glándulas paratiroides, en donde sufre dos escisiones para su activación, almacenamiento y posterior liberación. La vida media sérica de la PTH activada es de unos minutos y se elimina del suero rápidamente por el riñón y el hígado (18). La

liberación de la PTH depende de los niveles de calcio séricos, los cuales son censados por las células paratiroides a través de un receptor de superficie acoplado a proteína G, CaSR. Cuando los niveles de calcio se encuentran disminuidos, la PTH es liberada desde las glándulas paratiroides, mientras que los estados de hipercalcemia suprimen su liberación (20).

La PTH aumenta los niveles del calcio en el suero a través de sus efectos sobre los riñones, huesos e intestinos mediante la interacción con el receptor específico (18,21). En el riñón la PTH induce la reabsorción del calcio en el túbulo contorneado distal y disminuye la reabsorción del fosfato en el túbulo contorneado proximal. Además, la PTH estimula la producción de la enzima 1α -hidroxilasa que participa en la síntesis de vitamina D activa que, a su vez, participa en la reabsorción de calcio a nivel intestinal. Por otra parte, a nivel de hueso, la PTH actúa directamente sobre los osteoblastos, aumentando la expresión de RANKL, lo cual induce la activación osteoclástica induciendo a su vez, la remodelación ósea de la matriz extracelular, liberando calcio y fósforo (18).

Existen dos tipos de receptores para la PTH, el receptor tipo 1 y tipo 2 (PTH1R y PTH2R, respectivamente) que difieren en su expresión y ligando específico. El receptor PTH2R es codificado por el gen PTH2R ubicado en el brazo largo del cromosoma 2 (22), es expresado en el cerebro y es activado únicamente por la PTH (21). Por su parte, el receptor PTH1R es codificado por el gen PTH1R que se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 y mide alrededor de 29kpb (23), se expresa principalmente en huesos, riñones y cartílagos, pero también en otros tejidos, como el tejido vascular y ciertos órganos en desarrollo, y es activado igualmente por la PTH y el péptido relacionado a PTH (PTHrP).

En un estudio en 1984 Perry H. y Col., se demostró la presencia del receptor de la PTH (PTH1R) en los linfocitos de sangre periférica (24). Sin embargo, las acciones descritas sobre el sistema inmunológico son amplias y variadas, mostrando efectos tanto estimulantes como represores, dependiendo si el estudio se realiza en humanos o animales, o según el tipo de estudio (*in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) (25). Las

comorbilidades subyacentes de los pacientes estudiados también son factores determinantes.

Clásicamente existen dos escenarios diferentes de pacientes que elevan la PTH. Uno de ellos es la elevación como causa secundaria a otras patologías, principalmente insuficiencia renal crónica (**hiperparatiroidismo secundario**), que, cuando la estimulación de la paratiroides continúa de manera prolongada, puede resultar en la formación de un adenoma y la secreción autónoma de la hormona (**hiperparatiroidismo terciario**). Por otro lado, se puede presentar una hiperproducción autónoma de la PTH debido a un adenoma, en cuyo caso la elevación no está acompañada de otras alteraciones (**hiperparatiroidismo primario**) (26).

La evidencia clínica más relevante de los efectos inhibitorios de la PTH sobre el sistema inmunológico se deriva de pacientes con hiperparatiroidismo terciario debido a enfermedad renal en etapa terminal. Estos pacientes son más susceptibles a infecciones debido al desarrollo de una disfunción inmune de causas multifactoriales, lo que hace más difícil la interpretación de los resultados obtenidos sobre los efectos de la PTH (27,28).

Por otro lado, existen reportes que muestran la coexistencia de hiperparatiroidismo primario con condiciones inmunes relacionadas con hiperactividad de los linfocitos B. Dentro de estas patologías se encuentran diversas enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica crónica (29,30), la gammapatía monoclonal de significado incierto (29–31), el mieloma múltiple (32,33), y EAs como el LES (34), el SSp (35), el síndrome antifosfolípido (36), la artritis reumatoidea (37), la enfermedad celíaca (38,39), la enfermedad de Graves (40), la miastenia gravis (41), la polimiositis (42,43), vasculitis sistémicas (44), y anemia-trombocitopenia, entre otros ejemplos reportados. La mayoría de los casos reportados, sólo se refieren a la asociación clínica sin presentar análisis en respuesta al tratamiento del hiperparatiroidismo, sin embargo, la remisión total de la condición hematológica y autoinmune ha sido

reportada en algunos casos posterior al tratamiento del hiperparatiroidismo primario, mediante la resección de las glándulas paratiroides (35,45,46).

De esta manera, fue propuesto que altos niveles de PTH podrían alterar la función normal de los linfocitos B y desencadenar el desarrollo de EAs, mediada por la hiperactividad del linfocito B mediante dos posibles mecanismos. Por un lado, estimulando directamente a los linfocitos T y linfocitos B a través de la interacción con su receptor específico de la PTH en la superficie de estas células y, por otro lado, de forma indirecta, la PTH podría activar las células B mediante la inducción de IL-6 en células estromales/osteoblásticas (47).

En conjunto, lo anterior llevó a plantear en este estudio la evaluación de los efectos de la PTH y su receptor sobre los linfocitos B de pacientes con LES y SSp y su potencial de biomarcador de diagnóstico. Así mismo, con el objetivo de entender si la PTH puede ser un disparador de autoinmunidad, se plantearon experimentos *in vitro* sobre linfocitos B.

HIPÓTESIS

La PTH y la expresión de su receptor en linfocitos B pueden favorecer el desarrollo de la autoinmunidad a través de mecanismos directos, específicamente por la activación de estas células.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la PTH y el receptor de la Paratohormona (PTH1R) como biomarcadores de EAs (Lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren), y el posible efecto del eje PTH-PTHrP como desencadenante de autoinmunidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de superficie del PTH1R en los linfocitos B y subpoblaciones en pacientes con LES, SSp y HC.
2. Evaluar los cambios fenotípicos inducidos en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B luego de la estimulación con PTH en cultivos celulares.
3. Evaluar la tasa de apoptosis y proliferación celular en linfocitos B en respuesta a la estimulación con PTH en cultivos celulares.
4. Determinar la producción de inmunoglobulinas en linfocitos B posterior a la estimulación con PTH en cultivos celulares.
5. Definir las vías de señalización implicadas en la activación de los linfocitos B posterior a la estimulación con la PTH en cultivos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de la investigación

Estudio observacional transversal y experimental *in vitro*.

Población de estudio

Tamaño de muestra: Para el estudio observacional, se realizó inicialmente un análisis de muestra en Open Epi (versión 3), a partir de una prueba piloto, para definir el tamaño de muestra necesario para cada cohorte, con un intervalo de confianza del 95%, potencia de 80 y una proporción 1:1, obteniendo un tamaño de muestra de 15 para la cohorte de LES y 8 para la cohorte de SSp.

Criterios de inclusión: Fueron incluidos pacientes con LES según los Criterios de clasificación de 2012 para el lupus eritematoso sistémico (SLICC) (48), pacientes que cumplieron con la clasificación para el síndrome de Sjögren primario del “American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism” de 2016 (8) e individuos como controles sanos (HC) sin evidencia de enfermedad autoinmune.

Criterios de exclusión: Participantes que luego de la invitación, declinaran la firma del consentimiento informado. Asimismo, los participantes que, al momento de realizar el análisis celular por Citometría de Flujo, no contaron con el número suficiente de linfocitos B (al menos 5×10^3) fueron excluidos del estudio, sin embargo, no se tuvo en cuenta algún tratamiento en particular como criterio de exclusión. Adicionalmente pacientes que, por historial clínico y estudios de laboratorio,

presentaron diagnóstico de Insuficiencia Renal Crónica tampoco fueron incluidos en este estudio.

Los pacientes fueron valorados y reclutados en la Unidad de Reumatología de la Fundación Valle del Lili, un hospital de referencia regional en Cali, Colombia, bajo un muestreo no probabilístico por conveniencia. Para todos los grupos se incluyeron individuos mayores de 18 años que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

En los pacientes con LES y SSp, se registraron las manifestaciones clínicas presentes al momento de la toma de la muestra para determinar el índice de actividad con base en las escalas SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (49) y ESSDAI (EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index) (50), respectivamente. Ambos son modelos que, por medio de asignaciones de puntos a signos, síntomas o variables de laboratorio, permiten evaluar de manera estandarizada la actividad de la enfermedad y representan consensos de grupos de expertos en el campo de la investigación de cada enfermedad.

En el estudio experimental *in vitro* se trabajó con la línea celular de linfocitos B Ramos (RA1), aislada de un linfoma de Burkitt (estadounidense) de un paciente masculino de 3 años, obtenida de ATCC ® (Manassas, VA, USA).

Aspectos éticos

El presente estudio se clasificó como investigación de riesgo mínimo y se rigió por los principios y normativas nacionales e internacionales, entre otros, la Resolución 2378, Resolución 8430, Declaración de Helsinki, Reporte de Belmont y la Declaración Universal de los Derechos humanos. Fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Fundación Valle del Lili mediante el protocolo número 996 y por el Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi por las actas

N°158 y N°314. Durante el reclutamiento, se explicó el estudio y sus objetivos de manera detallada y comprensible a cada participante y todos aquellos que expresaron haber entendido el estudio y que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, firmaron el consentimiento informado aprobado previamente por los Comités de Ética.

Células y líneas celulares

Obtención de células mononucleares de sangre periférica. Se recolectaron muestras de sangre anticoagulada con EDTA_{K2} obtenidas de los participantes por punción venosa en sistema de vacío, y se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (MNSP) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-1077 (Sigma-Aldrich Co. LLC, Histopaque®-1077; densidad 1.077 g/mL).

Crecimiento y mantenimiento de líneas celulares. La línea celular de linfocitos B Ramos (RA 1), fue cultivada en medio de cultivo RPMI-1640 al 10% de Suero Fetal Bovino (SBF por sus siglas en inglés) inactivado por calor y 1% de penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), denominado a partir de ahora medio RPMI 1060 completo, e incubado a 37°C y 5% CO₂. Se realizó la renovación de medio, día de por medio, manteniendo una densidad celular de 1×10^6 células por mL. Se usaron las líneas celulares hasta máximo el pase 10 posterior a la descongelación para todos los experimentos.

Condiciones de estimulación *in vitro*

Los linfocitos B de la línea celular, fueron sembrados en medio RPMI 1060 completo en placas de 24 pozos a una concentración de 2×10^5 células/pozo suspendidas en 500 µL. Posteriormente se agregaron los estímulos CpG (ODN 2006, MACS Miltenyi

Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) a una concentración previamente reportada como estímulo de activación de Linfocitos B de la línea celular Ramos (51), y PTH humana (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA), teniendo en cuenta como punto de partida los niveles alcanzados en un estado de hiperparatiroidismo primario (52). Las estimulaciones se emplearon como se muestra a continuación, el Buffer Fosfato Salino (PBS por sus siglas en inglés) fue utilizado como control negativo de estimulación:

-Tratamiento A	5 μ L PBS 1x
-Tratamiento B	CpG 0.1 μ M
-Tratamiento C	CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/ μ L
-Tratamiento D	CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/ μ L
-Tratamiento E	CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/ μ L

Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas, o 24, 48, 72 y 96 horas para evaluación de proliferación celular, o 4 horas para la evaluación de la activación celular. Transcurrido este tiempo, las células fueron recolectadas para su análisis, y el sobrenadante fue almacenado a -80°C.

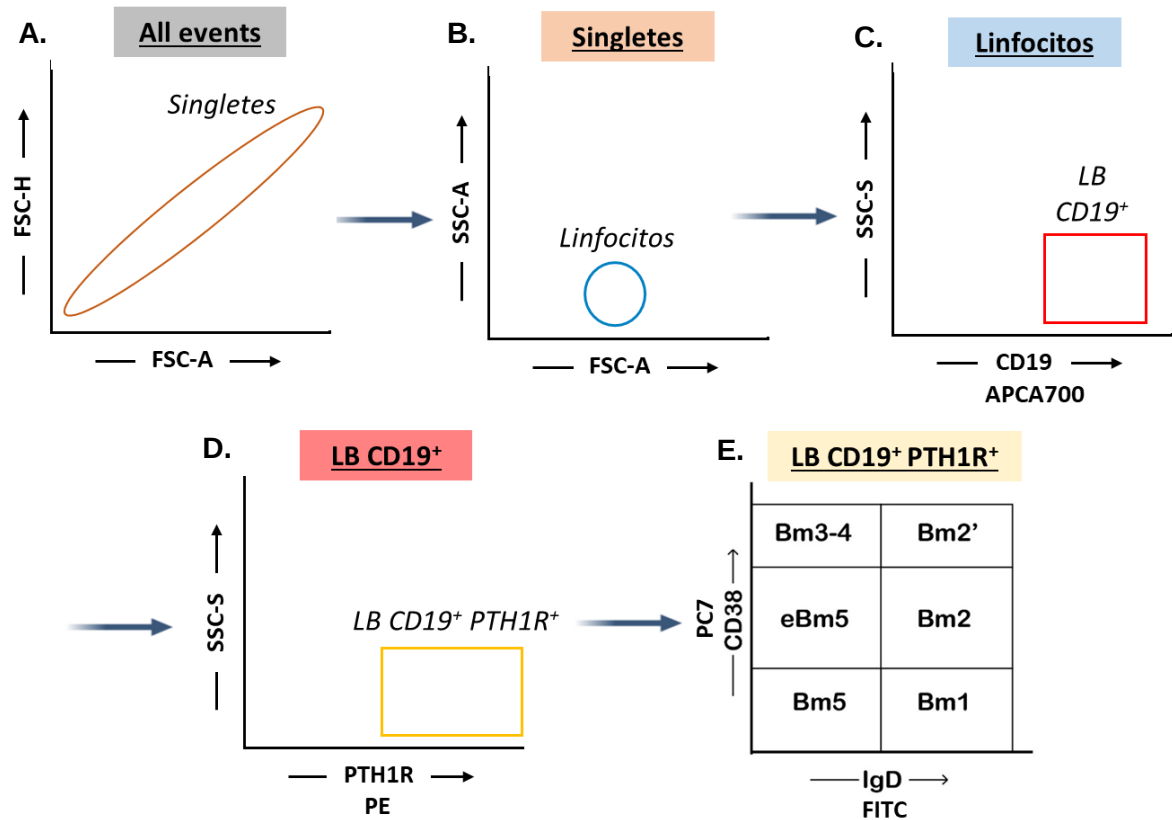
Citometría de flujo

Expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones. Diversas formas de clasificar a los linfocitos B de sangre periférica han sido utilizados partiendo de marcadores de superficie como CD19, CD20, IgD, CD27, CD38 y CD24, entre otros (53). Para este trabajo, se decidió evaluar el fenotipo de los linfocitos B periféricos, según la clasificación sugerida por Pascual y col. (54) y Bohnhorst y Col. (55), donde se caracterizan seis subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica por medio de citometría de flujo, teniendo en cuenta la expresión de los marcadores de

superficie IgD y CD38: IgD⁺CD38⁻ (Bm1, células vírgenes), IgD⁺CD38⁺ (Bm2, células fundadoras del centro germinal), IgD⁺CD38^{Hi} (Bm2', células fundadoras del centro germinal), IgD⁻CD38^{Hi} (Bm3-4, células del centro germinal), IgD⁻CD38⁺ (eBm5, early Bm5: células de memoria temprana) e IgD⁻CD38⁻ (Bm5, células de memoria) (**Figura 1E**).

Teniendo en cuenta lo anterior, para la medición del PTH1R en los linfocitos B de sangre periférica y la distribución de las subpoblaciones, los MNSP humanos recién aislados fueron incubados con 5 µL del anticuerpo primario anti-PTH1R humano al 5% (anticuerpo de conejo, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas una vez con PBS 1x y luego se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, con 5 µL de los anticuerpos anti-CD19 (conjugado con APC-A700, J3119; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), anti-CD38 (conjugado con PECy7, LS198-4-3; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), anti-anticuerpo de conejo al 10% (anti-IgG (H+L) conjugado con PE, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 10 µL de anti-IgD (conjugado con FITC, IgD26; MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Posterior a la incubación, se realizó un lavado, se suspendieron las células en PBS 1x y los datos fueron colectados en el citómetro Cytoflex S V4-B2-Y4-R3 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) y analizados usando el software CytExpert siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la **Figura 1**.

Figura 1. Estrategia de análisis de expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones

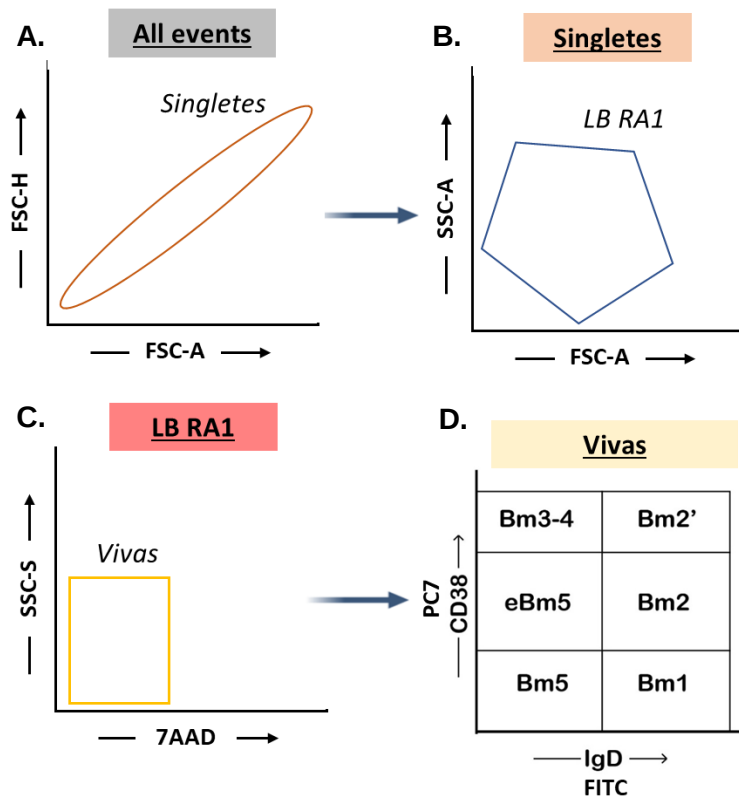


Estrategia de análisis **A.** Selección de células individuales usando el parámetro de tamaño medido en área (A, eje x) y altura (H, eje y) **B.** Distinción de linfocitos basado en características de tamaño y complejidad **C.** Selección de linfocitos B basado en la expresión del marcador CD19 por fluorescencia **D.** Selección de linfocitos B que expresan el receptor PTH1R por detección de fluorescencia **E.** Distribución de subpoblaciones de linfocitos B (Bm1-Bm5) que expresan el receptor, basado en los marcadores de superficie IgD (eje x) y CD38 (eje y) por fluorescencia.

Subpoblaciones en línea celular. Posterior a la incubación de las células con los estímulos en las diferentes condiciones, se recolectaron las células de cada condición y fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, con 5 μ L del anticuerpo anti-CD38 (conjugado con PECy7, LS198-4-3; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), 10 μ L de anti-IgD (conjugado con FITC, IgD26; MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), y 20 μ L del

marcador de viabilidad 7AAD (Beckman Coulter Company, Marseille, France). Posterior a la incubación, se suspendieron las células en PBS 1x y los datos fueron colectados en el citómetro Cytoflex S V4-B2-Y4-R3 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) y analizados usando el software CytExpert siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la **Figura 2**.

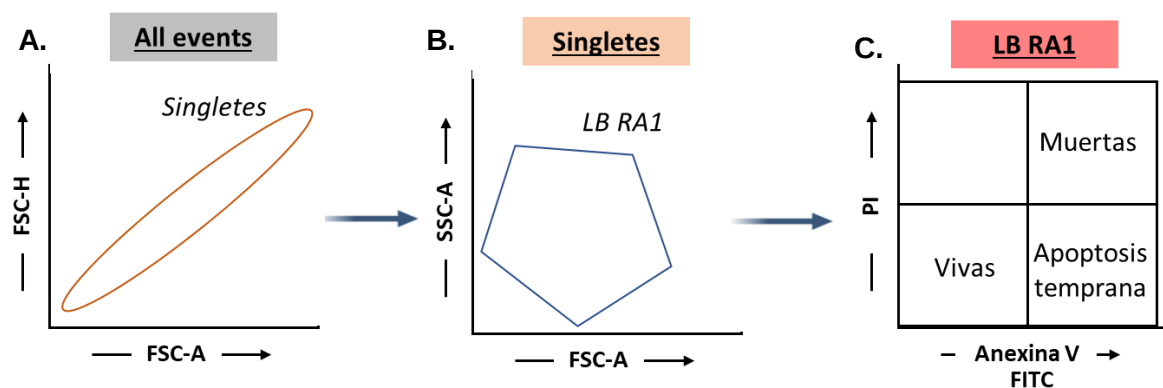
Figura 2. Estrategia de análisis de subpoblaciones en línea celular Ramos (RA1)



Estrategia de análisis. **A.** Selección de células individuales usando el parámetro de tamaño medido en área (A, eje x) y altura (H, eje y) **B.** Selección de población de células de la línea celular Ramos basado en características de tamaño y complejidad **C.** Exclusión de células muertas mediante selección negativa de población viva, las células muertas corresponden a aquellas en las que el 7AAD es detectable por fluorescencia **D.** Distribución de subpoblaciones de linfocitos B (Bm1-Bm5), basado en los marcadores de superficie IgD (eje x) y CD38 (eje y) por fluorescencia.

Ensayo de apoptosis en línea celular. Posterior a la incubación de las células con los estímulos en las diferentes condiciones, se recolectaron las células de cada pozo y se realizó la tinción con Ioduro de Propidio (PI por sus siglas en inglés) y con Anexina V conjugada con FITC utilizando el kit APOAF (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA). Brevemente las células fueron suspendidas en buffer de unión 1x e incubadas con 5 μ L de Anexina V-FITC y 10 μ L de PI durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, e inmediatamente después, se realizó la lectura por citometría de flujo en el equipo Cytoflex S V4-B2-Y4-R3 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) y se separaron las células en un gráfico DotPlot distinguiendo células vivas, apoptóticas tempranas y muertas como se muestra en la **Figura 3**.

Figura 3. Estrategia de análisis de apoptosis en línea celular Ramos (RA1)



Estrategia de análisis. **A.** Selección de células individuales usando el parámetro de tamaño medido en área (A, eje x) y altura (H, eje y) **B.** Selección de población de células de la línea celular Ramos basado en características de tamaño y complejidad **D.** Distinción de células vivas (AnexinaV⁻PI⁻), en apoptosis temprana (AnexinaV⁺PI⁻) o tardía (AnexinaV⁺PI⁺) por detección de Anexina V y PI por fluorescencia

Proliferación celular en línea celular. A partir de los linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1), se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer con azul de Tripán al 0.4% y se dispuso un mínimo de 1×10^6 células y un máximo de 1×10^7 células en tubos Falcon de 50 mL según diseño experimental requerido. Las células fueron lavadas dos veces y suspendidas en 500 μ L de PBS 1x, posteriormente se

adicionó 500 μ L de una solución de trabajo de CFSE a una concentración de 0.125 μ M para una concentración final de 0.062 μ M. La incubación se realizó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 5 minutos y se detuvo la reacción adicionando 1 mL de SBF durante 1 minuto a 4°C. Finalmente, se realizó un lavado con 10 mL de PBS 1x frío y se suspendieron las células con medio RPMI 1060 completo a la concentración deseada para la estimulación. Las células fueron recolectadas a las 24, 48, 72 y 96 horas; e incubadas con 20 μ L de 7AAD (Beckman Coulter Company, Marseille, France) durante 20 minutos para descartar células muertas del análisis de proliferación. Los datos fueron colectados en el citómetro Cytoflex S V4-B2-Y4-R3 (© Beckman Instruments, Inc.) y analizados usando el software FlowJo™v10.6.1 (BD Life Sciences).

Cuantificación de inmunoglobulinas (ELISA)

A partir de los sobrenadantes colectados posterior a la incubación de las células con los estímulos en las diferentes condiciones, se realizó la medición de las inmunoglobulinas mediante ELISA usando kits disponibles comercialmente específicos para detección de IgG e IgM humano (ab195215 y ab214568, respectivamente; Abcam, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de las inmunoglobulinas se calculó con la ecuación de regresión lineal obtenida con soluciones estándar.

Detección de proteínas fosforiladas (Inmunoblot)

Para la detección de proteínas fosforiladas que hacen parte de la vía de señalización de activación del linfocito B, se realizó la técnica de inmunoblot. Inicialmente, se obtuvo un lisado de proteínas, a partir de 1×10^6 células posterior a la incubación con

los estímulos en las diferentes condiciones durante 4 horas. Las células fueron incubadas con Buffer Pierce™ RIPA (Thermo Scientific, Rockford, USA), inhibidores de proteasas (Halt™78429, Thermo Scientific, Rockford, USA) e inhibidores de fosfatasas (Halt™78426, Thermo Scientific, Rockford, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los lisados fueron cuantificados por el método de ácido bicinconínico (BCA) mediante el uso de un kit comercial (BCA1 AND B9643, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA) siguiendo el protocolo para cuantificación en placas de 96 pozos. Los lisados fueron liofilizados y reconstituidos a una concentración final de 1 µg/µL para los siguientes pasos.

Las proteínas fueron separadas, según su peso, por electroforesis SDS-PAGE en gel de 7.5% poliacrilamida a partir de 20 µg de lisado proteico. La migración se realizó a 80V durante 120 minutos. Se realizó una transferencia en húmedo por medio del sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, Inc. California) con membrana PVDF a 4°C y 270mA por 70 minutos. Posteriormente, se incubó la membrana con el reactivo comercial EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Japan) durante 5 minutos en agitación constante para el bloqueo. Para la detección, se incubaron las membranas durante 18 horas a 4°C en agitación constante con anticuerpos primarios de conejo (**Tabla 3**) y luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo IgG asociado a HRP (dilución 1:3000, policlonal, Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante. El revelado se realizó por quimioluminiscencia con el kit comercial Clarity™ Western ECL Substrate (#170-5060, Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) y la detección se realizó en el equipo Amersham Imager 600 (GE Life Sciences, Buckinghamshire, UK).

Tabla 3. Anticuerpos primarios para detección de proteínas en Inmunoblot

Referencia	Especificidad de anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Dilución
#2732 ^a	Lyn	56	1:500
#2731 ^a	Phospho-Lyn (Tyr507)	53,56	1:250
#2457 ^a	B-actina (D6A8)	45	1:2000

^a Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA

Análisis estadístico

En el estudio observacional, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar distribución de normalidad, Kruskal-Wallis para comparaciones entre grupos y la prueba de Spearman para las correlaciones entre variables cuantitativas. En el estudio experimental, el análisis de la relación de las variables se realizó con ANOVA de uno o dos factores y las comparaciones múltiples de Dunnett y Tukey respectivamente, según las necesidades. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron significativos. Para el análisis de los resultados se usó el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Caracterización de participantes

En este trabajo se incluyeron un total de 54 casos, de los cuales 14 tenían diagnóstico de LES (14, 100% eran mujeres, mediana de edad 30 años IQR 33), 20 tenían diagnóstico de SSp (17, 85% mujeres; 66 años IQR 16) y 20 fueron HC (17, 85% mujeres; 28 años IQR 5).

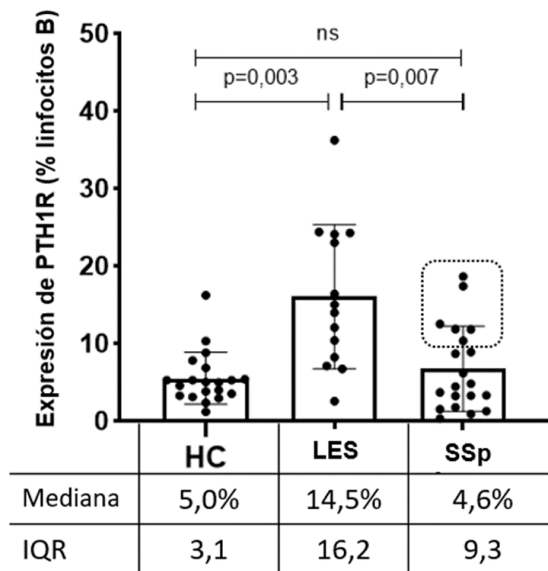
Expresión del PTH1R en linfocitos B y subpoblaciones

La expresión de PTH1R fue medida por citometría de flujo, teniendo en cuenta el porcentaje de linfocitos B que expresaron el receptor (**Figura 1D**). Un mayor porcentaje de linfocitos B de pacientes con LES expresaron el receptor PTH1R (14.5%, IQR 16.2) en comparación con HC (5.0%, IQR 3.1) ($p = 0.003$) y SSp (4.6% IQR 9.3) ($p = 0.007$) (**Figura 4**). A pesar de lo anterior, es importante destacar que algunos pacientes con SSp mostraron niveles de expresión de PTH1R tan altos como los pacientes con LES ($n = 6$, 10.3 – 18.7%) (**Figura 4, recuadro punteado**), y esta elevada expresión se correlacionó de manera significativa con el índice de actividad de la enfermedad del Síndrome de Sjögren del EULAR (ESSDAI, por sus siglas en inglés) (mediana 3 IQR 6, $r = 0.490$, $p = 0.028$); ocurrió lo contrario en el LES, donde la expresión de PTH1R no se correlacionó con el índice de actividad de la enfermedad LES (SLEDAI, por sus siglas en inglés)-2K (mediana 2 IQR 8, $r = -0.123$, $p = 0.676$).

Debido a que la edad de presentación del LES y el SSp es diferente, se realizaron análisis para determinar si esta variable pudiera influir en la diferencia de expresión

del PTH1R en los linfocitos B. De esta forma se comparó la edad entre grupos: valor de **p-global= 0.000**, HC vs LES: $p= 1$, HC vs SSp: **$p= 0.000$** , LES vs SSp: **$p= 0.009$** , sin embargo, esta diferencia no se correlacionó con la expresión de PTH1R entre los grupos (Rho de Spearman: $r: -0.43$; $p= 0.756$).

Figura 4. Expresión de PTH1R en Linfocitos B

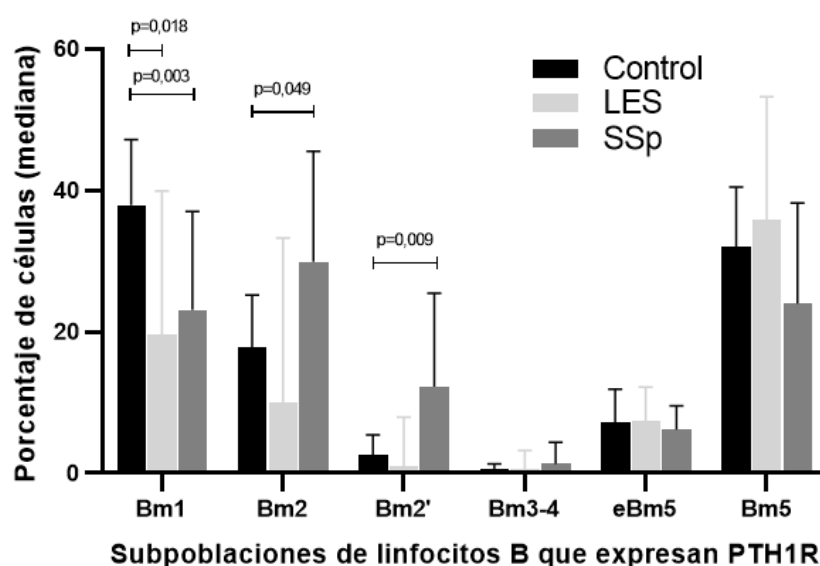


Expresión de PTH1R en linfocitos B. Medido como el porcentaje (%) de células que expresaron el receptor por citometría de flujo en HC y pacientes con LES y SSp. El recuadro punteado enfatiza los pacientes de SSp con porcentajes elevados de células que expresan PTH1R. En el recuadro inferior, se muestran las medidas de mediana y Rango Inter cuartilico (IQR) para la expresión en cada una de las cohortes. La comparación fue realizada por Kruskal-Wallis y se consideraron valores de $p<0.05$ como significativos.

Al realizar el análisis de las subpoblaciones de linfocitos B, estas no mostraron diferencias en su distribución cuando se compararon entre SSp y LES con HC (**Anexo 1**). Sin embargo, la distribución de estas subpoblaciones de linfocitos B que expresaron el receptor de PTH1R mostró una diferencia en pacientes con SSp en comparación con HC (**Figura 5**). La distribución de Bm1 que expresa PTH1R fue significativamente menor en SSp (20.2%) y LES (19.6%) que en HC (39%) (**$p= 0.003$**

y $p= 0.018$, respectivamente), mientras que Bm2 (30.5%) y Bm2' (8.7%) fueron mayores en SSp en comparación con HC (18%: $p= 0.045$ y 1.7%: $p= 0.009$, respectivamente). La distribución de Bm3-4 (0.4, 0.5, 0.2%), eBm5 (6.4, 7.3, 6.1%) y Bm5 (31.5, 35.8, 21.2%) que expresaron PTH1R fueron similares entre HC, LES y SSp, respectivamente (**Figura 5**).

Figura 5. Distribución de subpoblaciones de linfocitos B PTH1R⁺



Distribución fenotípica de linfocitos B que expresan PTH1R. Medido como el porcentaje (%) de células presente en cada fenotipo (Bm1-Bm5) determinado por citometría de flujo a partir de la expresión de los marcadores de superficie IgD y CD38, en controles, LES y SSp. La comparación fue realizada por Kruskal-Wallis y se consideraron valores de $p<0.05$ como significativos.

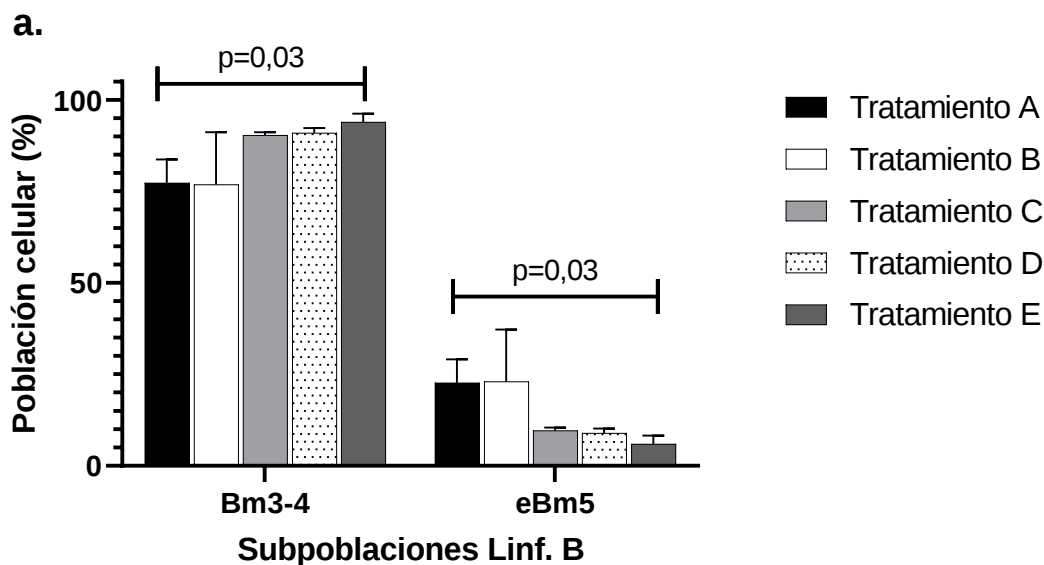
Efecto de la estimulación con PTH sobre la distribución de las subpoblaciones en linfocitos B

En primer lugar, se caracterizó la expresión del receptor PTH1R en los linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1), obteniendo que estas células expresaban el

receptor en un 46.96% (**Anexo 2a**). Adicionalmente, el fenotipo de los linfocitos B de esta línea celular fue identificado, teniendo en cuenta la expresión de los marcadores de superficie IgD y CD38 (**Figura 2D**), mostrando una distribución predominante de Bm3-4 (**Anexo 2b**), correspondiente a células del centro germinal.

Posteriormente, se evaluó mediante citometría de flujo si la PTH ejercía algún efecto en el fenotipo de estas células. Luego de 48 horas de ser estimuladas como se describió previamente, se observó que, bajo estimulaciones de la PTH a concentraciones más altas, en forma sinérgica con CpG, las células B mantuvieron el fenotipo Bm3-4 ($93.4\% \pm 2.3$ para la concentración más elevada de PTH vs $77.3\% \pm 6.4$ en las células sin estímulo, $p=0.03$), en comparación con las células B no estimuladas que se diferenciaron al fenotipo eBm5 ($6.0\% \pm 2.2$ para la concentración más elevada de PTH vs $22.7\% \pm 6.4$ en las células sin estímulo, $p=0.03$) (**Figura 6a y 6b**).

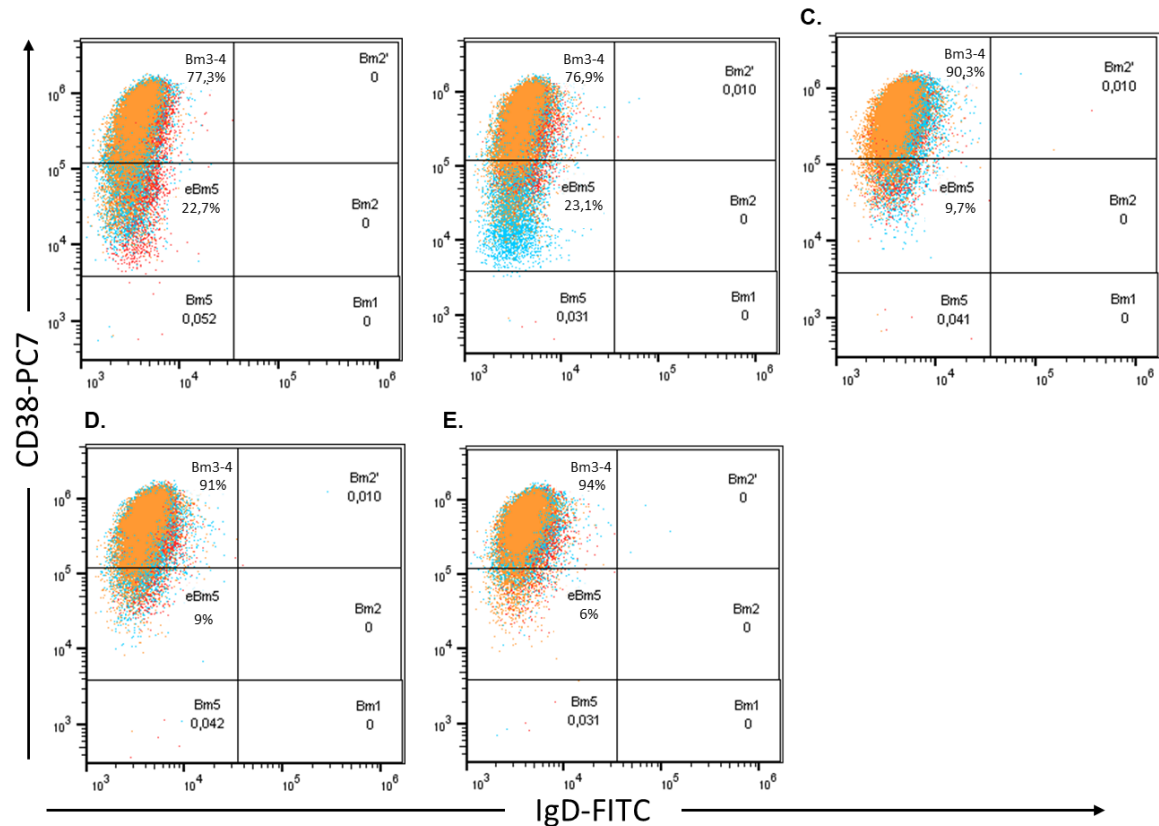
Figura 6. Cambios fenotípicos de los linfocitos B estimulados con PTH.



Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas por 48 horas con tratamiento A (sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL). Los análisis estadísticos incluyeron 3 réplicas experimentales y Bm3-4 y eBm5 como únicos factores

analizados, se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores y comparación múltiple de Dunnett, se tomaron en cuenta valores significativos de $p < 0.05$

b.



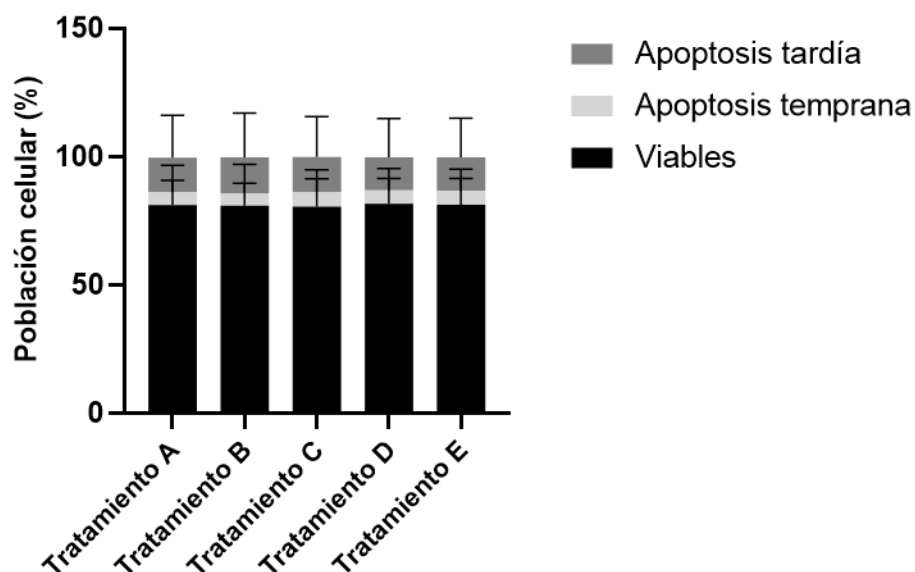
Representación citometría. Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas por 48 horas, sin estímulo (A), estimuladas con CpG 0.1 μ M (B), CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL (C), CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL (D) y CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL (E). La imagen es representativa de los resultados de 3 de 5 réplicas

Efecto de la estimulación con PTH en la sobrevivencia de los linfocitos B

Los linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1) fueron incubados con dosis crecientes de PTH durante 48 horas y se detectó la apoptosis mediante citometría de flujo usando la tinción de AnexinaV-FITC/PI. El porcentaje de células viables ($81.0\% \pm 14.7$), en apoptosis temprana ($5.3\% \pm 4.6$) y tardía ($13.4\% \pm 16.0$), fue

similar tanto en las células sin estimular como en las estimuladas con PTH (**Figura 7**).

Figura 7. Sobrevida de los linfocitos B estimulados con PTH

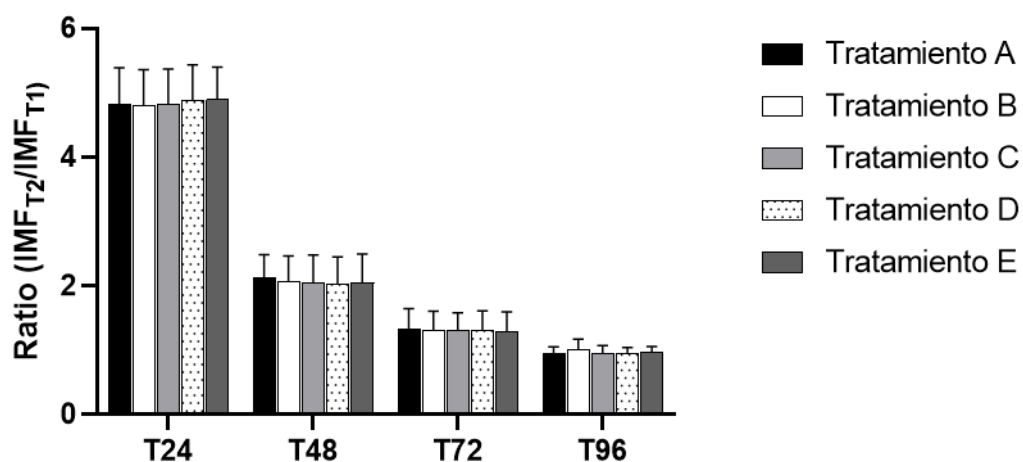


Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas y estimuladas con tratamiento A (Sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL) durante 48 horas. Los histogramas representan el promedio obtenido de 5 réplicas experimentales. Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores y comparación múltiple de Dunnett, se tomaron en cuenta valores significativos de $p < 0.05$

Efecto de la estimulación con PTH en la proliferación de los linfocitos B

Posterior a la incubación de los linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1) con dosis crecientes de PTH, se evaluó la proliferación celular por medio de la determinación de CFSE por citometría de flujo. La proliferación fue calculada como una ratio entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida en el tiempo 2 sobre la IMF del tiempo 1. No se observaron diferencias en las ratios de proliferación en ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 8**).

Figura 8. Proliferación celular de linfocitos B estimulados con PTH.

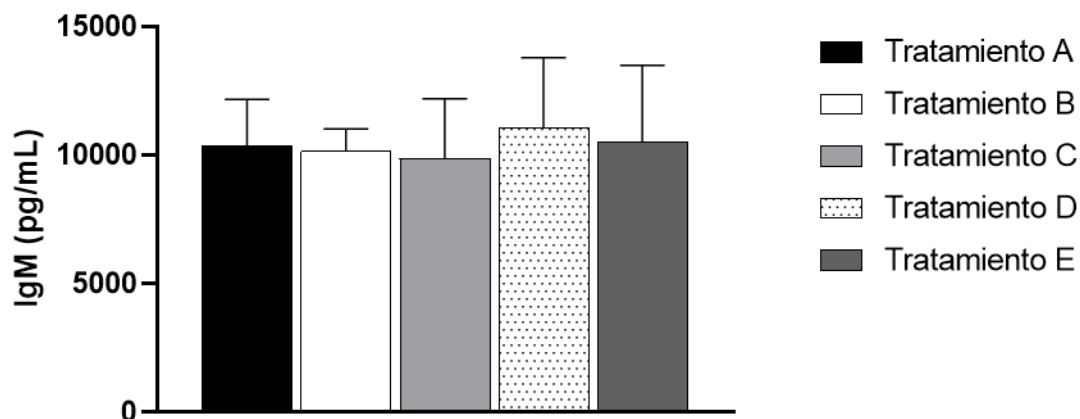


Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas y estimuladas con tratamiento A (Sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL), a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los histogramas representan la proporción de la IMF del CFSE leída en el tiempo 2 sobre el tiempo 1, donde T2 corresponde al tiempo inmediatamente mayor en donde se realizó la lectura. Los datos son representativos de 5 réplicas experimentales. Se aplicó la prueba de ANOVA de dos factores y comparación múltiple de Dunnett, se tomaron en cuenta valores significativos de $p < 0.05$

Efecto de la estimulación con PTH en la producción de inmunoglobulinas

Se realizó la cuantificación, mediante ELISA, de las inmunoglobulinas liberadas en el sobrenadante de los cultivos celulares de la línea celular Ramos (RA1) estimulados con dosis crecientes de PTH. Al ser una línea celular productora de IgM, no se detectaron niveles de IgG en el rango de detección de la prueba (0.23 ng/ml - 15 ng/ml). La concentración de IgM fue similar en el sobrenadante de las células sin estimular (10365 pg/mL $\pm$ 1792) como en las estimuladas con PTH (10468 pg/mL $\pm$ 2681, en promedio) (**Figura 9**).

Figura 9. Cuantificación de IgM en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos B estimulados con PTH



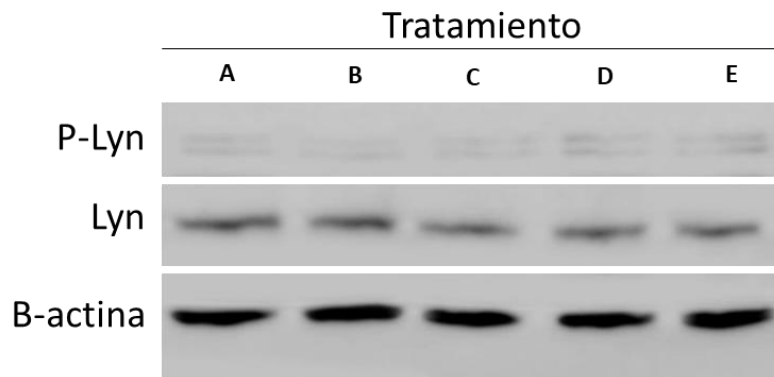
Cuantificación por ELISA de los niveles de IgM en sobrenadante de cultivo celular de línea celular Ramos estimuladas con tratamiento A (Sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL) durante 48 horas. Los datos son representativos de 5 réplicas experimentales. se aplicó la prueba de ANOVA de un factor y comparación múltiple de Turkey, se tomaron en cuenta valores significativos de $p < 0.05$

Efecto de la estimulación con PTH en la activación intracelular del linfocito B

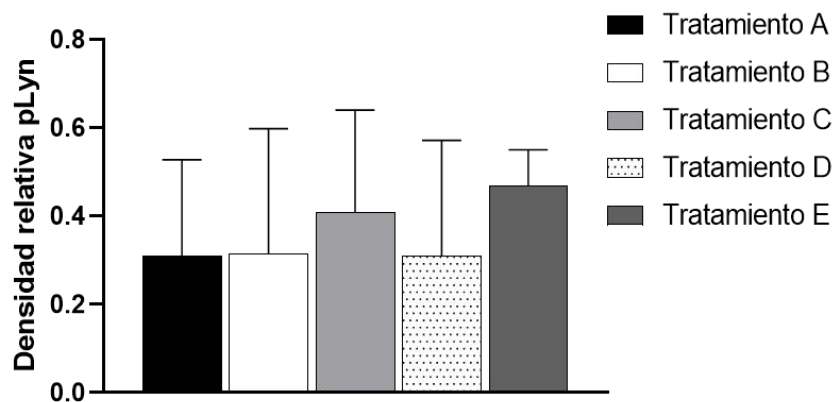
Para determinar el efecto de la PTH en la activación del linfocito B, se analizaron los cambios en la fosforilación de Lyn, una proteína tirosina quinasa clave en la vía de señalización temprana del linfocito B, mediante Inmunoblot. Como se observa en la **Figura 10**, posterior a la estimulación con PTH, no hubo cambios significativos en la fosforilación del residuo de tirosina 507 de Lyn en las células B de la línea celular Ramos (RA1) (**Figura 10a y 10b**). Sin embargo, es importante rescatar que en una de las réplicas experimentales se observó una disminución evidente en la fosforilación de Lyn que no fue posible concluir en los siguientes experimentos (**Anexo 3**).

Figura 10. Efectos de la PTH en la señalización intracelular en linfocitos B de la línea celular Ramos (RA1)

a.



b.



Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas y estimuladas con tratamiento A (sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL), durante 4 horas. Los niveles de proteínas fueron medidos con Inmunoblot (a). Todos los datos representan la media y desviación estándar de 5 réplicas experimentales. se aplicó la prueba de ANOVA de un factor y comparación múltiple de Turkey (b)

DISCUSIÓN

Las EAs son complejas y su origen multifactorial implica un mayor reto para el diagnóstico y el entendimiento de su fisiopatología. La interacción coordinada entre múltiples sistemas permite mantener un equilibrio en el organismo, entre los mecanismos reguladores de la autorreactividad fisiológica y el desarrollo de la patología autoinmune. Existen diversos factores involucrados en el “mosaico de la autoinmunidad” que establecen en conjunto escenarios de susceptibilidad, pérdida de la tolerancia hacia lo propio y finalmente el desarrollo de patologías autoinmunes (9).

Numerosos estudios, tanto a nivel clínico como experimental, se han desarrollado con el fin de elucidar las causas, mecanismos patogénicos y proponer modelos de varias enfermedades autoinmunes, sin embargo, existen aún muchas incógnitas por resolver(56,57).

Con base en observaciones clínicas, se consideró la posibilidad de que la PTH estuviera relacionada con el desarrollo de EAs y se evaluó inicialmente la expresión del receptor PTH1R en los linfocitos B de pacientes con LES y SSp comparados con HC. Se encontró que en LES existe un marcado incremento de linfocitos B que expresan el receptor PTH1R en comparación con los HC y que, en pacientes con SSp los niveles elevados están correlacionados con una mayor actividad de la enfermedad. Previamente, en 1984, Perry y col., describieron la presencia del receptor PTH1R en linfocitos humanos circulantes (24). Sin embargo, los niveles de expresión del receptor en los linfocitos B no habían sido caracterizados hasta el momento. Los hallazgos de este trabajo establecen una línea base de expresión de PTH1R en linfocitos B de HC y sugieren que, cuando se expresa en niveles altos, podría ser un biomarcador útil en LES y un marcador de actividad de la enfermedad en SSp.

Las células del sistema inmune cuentan con receptores descritos para la mayoría de las hormonas, entre los cuales se pueden encontrar receptores intracelulares como los receptores de glucocorticoides o estrógenos, receptores de la familia de citoquinas clase I como el receptor de la hormona de crecimiento, receptor de prolactina y de Leptina, o receptores acoplados a proteína G como los receptores adrenérgicos (12). Varios de los efectos de la interacción de las hormonas y los receptores sobre las células del sistema inmune han sido bien caracterizadas. Un ejemplo de esto es la prolactina. Esta hormona activa vías de señalización en células inmunes por medio de la unión a su receptor, y actúa como un inmunoestimulante, incrementando la secreción de citoquinas y quimioquinas por parte de los macrófagos, la presentación antigénica de las células dendríticas, la proliferación de los linfocitos T y linfocitos B, entre otras (58). Los receptores de prolactina se han encontrado expresados en células B en médula ósea, resaltando su influencia en el desarrollo del linfocito B (59). Se ha observado, además, que la prolactina puede inhibir la selección negativa de linfocitos B autorreactivos y niveles elevados de esta hormona han sido relacionados con el desarrollo de EAs, incluyendo LES y SSp (58). Otras hormonas sexuales como los estrógenos han sido relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes y se les atribuye la causa de la alta prevalencia en mujeres en comparación con los hombres (60). Los estrógenos tienen funciones tanto en el potenciamiento como en la inhibición de las reacciones inmunes, esta variación funcional es dosis dependiente, las concentraciones fisiológicas o concentraciones bajas son proinflamatorias, mientras que altas concentraciones son antiinflamatorias (60). Los estrógenos pueden modular la activación de los linfocitos y se ha propuesto que un incremento de esta hormona puede causar una desregulación de la expresión del gen AIRE, desencadenando patología autoinmune mediada por linfocitos T como principal mecanismo patogénico (61), sin embargo, se ha descrito recientemente el impacto de la deficiencia del gen AIRE en la generación de linfocitos B autorreactivos y la producción de autoanticuerpos (62).

Teniendo en cuenta lo anterior, una mayor expresión del receptor PTH1R en los linfocitos B podría afectar la activación y selección de dichas células, convirtiéndose eventualmente en un posible factor de riesgo para el desarrollo de autoinmunidad. Este factor de riesgo que, al acompañarse de algún factor desencadenante, como una condición patológica en la que la hormona PTH se eleva considerablemente, como en el caso del hiperparatiroidismo primario, puede desencadenar la pérdida de la tolerancia hacia lo propio y el desarrollo de patología autoinmune. Sin embargo, más estudios deben ser realizados para establecer esta asociación.

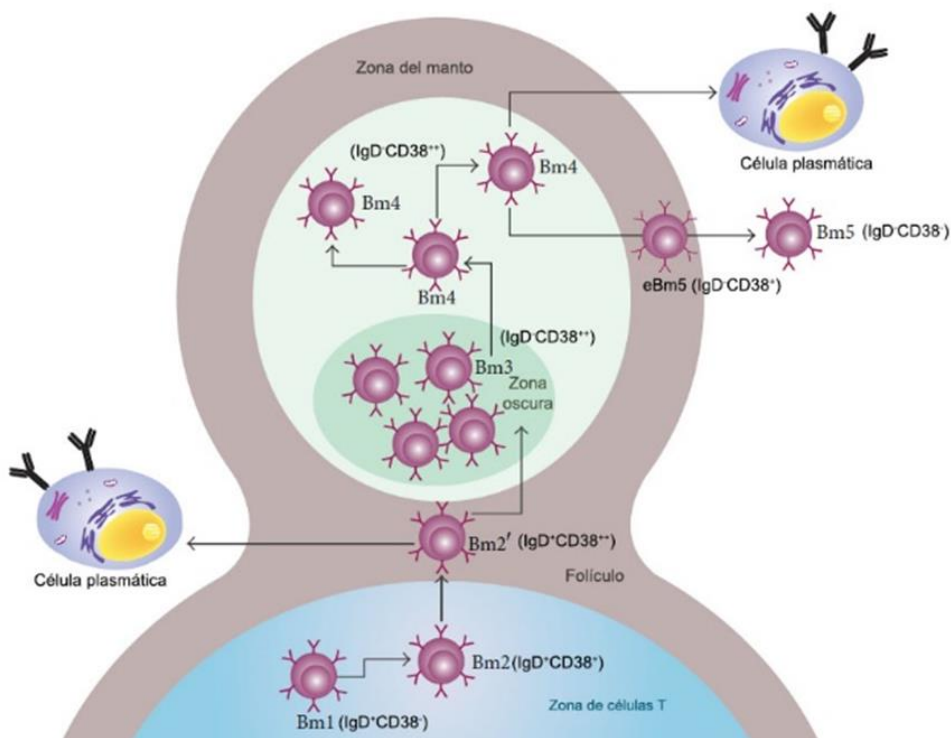
Los linfocitos B juegan un papel importante en el desarrollo de las EAs, especialmente el LES y el SSp, en donde estados de hiperactividad celular son característicos (63). Diversos marcadores han sido descritos para caracterizar y clasificar los diferentes estadios de maduración y del desarrollo del linfocito B en búsqueda de la caracterización de fenotipos de poblaciones definidas, la descripción de su importancia funcional y asociación con algunas patologías (64). De manera global, los linfocitos B inician su generación u ontogenia en la médula ósea donde pasan por diferentes estadios de maduración, migran de la médula ósea como linfocitos B inmaduros y posteriormente en linfocitos B transicionales en sangre periférica. Finalmente, terminan su proceso de maduración en el Bazo en donde se diferencian en linfocitos B de Zona Marginal o Linfocitos B foliculares. Estos últimos, migran a los folículos linfoides en donde, al encontrarse con los antígenos a los que son específicos, inician una reacción de centro germinal que culmina en la diferenciación hacia células de memoria o células plasmáticas de larga vida que migran nuevamente a la médula ósea donde cuentan con un nicho que les facilita las señales de supervivencia necesarias y son las encargadas de liberar anticuerpos durante un periodo prolongado de tiempo (1).

El uso de marcadores de superficie como CD19, CD20, IgD, CD27, CD38 y CD24, permite diferenciar linfocitos B desde el punto de vista del desarrollo, caracterizando las células B principales en sangre periférica (linfocitos B transicionales, linfocitos B

vírgenes, linfocitos B de memoria, linfocitos B reguladores, células plasmáticas) (53). Pascual y col., propusieron una clasificación de los linfocitos B maduros, basado en la activación en el centro germinal, proponiendo la clasificación de 7 subpoblaciones basadas en la expresión de los marcadores de superficie IgD y CD38 (**Figura 11**) (54).

Estas poblaciones han sido detectadas en sangre periférica, lo que sugiere que células que están en proceso de maduración en órganos linfoides secundarios pueden escapar del centro germinal hacia la circulación. La distribución de estas células en sangre periférica ha sido descrita en pacientes con SSp, observando un incremento en las subpoblaciones Bm2 y Bm2' y una disminución de Bm5 y eBm5, estas alteraciones son específicas de pacientes con Síndrome de Sjögren cuando se han comparado con controles u otros pacientes con autoinmunidad como artritis y LES, y se ha propuesto como una herramienta diagnóstica de la enfermedad (55,65).

Figura 11. Representación del linfocito B en el centro germinal



Representación de la distribución de los linfocitos B maduros en el centro germinal, según la expresión de los marcadores de superficie IgD y CD38. IgD⁺CD38⁻ (Bm1, células vírgenes), IgD⁺CD38⁺ (Bm2, células fundadoras del centro germinal), IgD⁺CD38^{Hi} (Bm2', células fundadoras del centro germinal), IgD⁻CD38^{Hi} (Bm3-4, células del centro germinal), IgD⁻CD38⁺ (eBm5, células de memoria temprana) e IgD⁻CD38⁻ (Bm5, células de memoria). Tomado y modificado de G Tobón y Col., / Autoimmune Dis. (2013) (66).

Ahora bien, teniendo en cuenta la clasificación propuesta por Pascual y Col., y los informes previos que sugieren una mayor distribución de las subpoblaciones Bm2 y Bm2' como característica de diagnóstico en pacientes con SSp, se evaluó las distribuciones de las subpoblaciones caracterizadas por la expresión de los marcadores de superficie CD38 e IgD (Bm1-Bm5), observando resultados de distribución similares en los pacientes incluidos en este estudio, pero sin diferencias significativas en las subpoblaciones totales del linfocito B.

En contraste, al evaluar esta distribución a partir de los linfocitos B que expresaron el receptor PTH1R, se observó que la subpoblación Bm1 de los pacientes con SSp y LES fue más baja que los HC, y las subpoblaciones Bm2 y Bm2' fueron más altas en los pacientes con SSp. Esto es muy importante porque, como se mencionó antes, estos linfocitos B son fundadores del centro germinal y, en un estado de hiperparatiroidismo, la señalización de PTH1R sobre expresada podría potenciar la activación de la respuesta inmune, sobre estimulando las células B autorreactivas y desencadenando una pérdida de la tolerancia inmunológica.

Para entender el posible efecto de la interacción de la PTH con su receptor PTH1R sobre los linfocitos B, se realizaron análisis *in vitro* en donde se estimularon células de la línea celular Ramos (RA1) en las cuales se detectó la expresión del receptor. Diversas interacciones ligando-receptor han sido estudiadas en términos del efecto sobre los linfocitos B y su relación con el desarrollo de EAs. Un ejemplo de lo anterior es la descripción de BAFF como un factor desencadenante de pérdida de la tolerancia y desarrollo de autoinmunidad. Diversos estudios han descrito el efecto de esta proteína en la proliferación, supervivencia, diferenciación, producción de

inmunoglobulinas, señalización intracelular, entre otras (67–69). Siendo estos, procesos celulares relevantes que conservan el equilibrio funcional en el organismo. De esta manera, si alguno falla o se ve alterado por las interacciones bajo estudio, entonces puede generar pérdidas de la tolerancia a nivel fisiológico, desencadenar enfermedad, o generar un mayor impacto en la actividad o severidad de las patologías. En este sentido, se evaluó el efecto de la estimulación de la PTH sobre los linfocitos B, determinando su impacto en la proliferación, supervivencia, subpoblaciones, producción de inmunoglobulinas y activación celular. Los experimentos demuestran que, a nivel *in vitro*, el fenotipo de los linfocitos B se modifica con las concentraciones crecientes de PTH, manteniendo las células estimuladas en el fenotipo Bm3-4, mientras que las no estimuladas se diferenciaron hacia células de memoria temprana (eBm5).

Como se mencionó anteriormente, los fenotipos Bm3 y Bm4 corresponden a las células del centro germinal (centroblastos y centrocitos, respectivamente). En la reacción del centro germinal, las células activadas sufren un proceso de recombinación de cambio de clase y de maduración de la afinidad por hipermutación somática (SHM, por sus siglas en inglés) (1). Las células normalmente pueden sufrir varios procesos de SHM antes de ser seleccionadas y diferenciadas a células de memoria o células plasmáticas de vida larga (70). Sin embargo, el hallazgo de que altas concentraciones de PTH retienen las células, a nivel *in vitro*, en un fenotipo de centroblastos/centrocitos, puede implicar que estas células pasen por más ciclos en la reacción del centro germinal, que implica básicamente, un incremento de las reacciones de SHM. Esto podría generar al menos dos tipos de impacto a nivel del desarrollo de la autoinmunidad. Por un lado, se ha demostrado que la SHM tiene el potencial de contribuir a la generación de células B autorreactivas, esto ha sido demostrado tanto en un modelo murino propenso a Lupus (71) como en humanos con LES (72,73). Por lo que en el modelo de hiperparatiroidismo podría estar relacionado con la generación *de novo* de células autorreactivas que explicaría su relación con el desarrollo de la patología autoinmune.

Por otra parte, durante los ciclos de la reacción del centro germinal se da un proceso de selección positiva, en el que células que no tienen la suficiente afinidad para interactuar con las células dendríticas o linfocitos T foliculares no reciben las señales de supervivencia necesarias y terminan en muerte celular (74). En este caso, un incremento de la afinidad en células autorreactivas dada por un incremento de SHM, podría inducir un rescate de la apoptosis de estas células y contribuir de esta manera a la autoinmunidad. Es necesario realizar estudios adicionales para confirmar estas hipótesis.

Finalmente, se evaluó la posible vía de señalización implicada en la interacción de la PTH con su receptor PTH1R en los linfocitos B. De manera general, las vías de señalización de la activación del linfocito B implican una cascada de reacciones, principalmente de fosforilación, por parte de proteínas quinasas. Posterior a la estimulación por el antígeno (por medio del BCR, receptor del linfocito B), las moléculas accesorias del receptor, $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, median la activación de Syk, que se fosforila en fosfo-Syk, con ayuda de Lyn activado, esto genera en conjunto la activación de diversas proteínas aguas abajo, que conducen a la activación de factores de transcripción (1).

Cada residuo de fosfotirosina realiza una función distinta al interactuar con una molécula diferente y su posición está relacionada directamente con esta función. Debido a esto, no siempre la detección de una proteína fosforilada indica un estado de activación. En el caso particular de la proteína Lyn, la fosforilación del residuo de tirosina en la posición 507 (pY507) mantiene la proteína en una configuración cerrada inactiva. La activación de la proteína implica la defosforilación de este residuo pY507, lo que genera un cambio conformacional que permite la fosforilación del residuo de tirosina en la posición 397 (pY397) que estimula la actividad quinasa de la enzima (75). Bajo las condiciones de estimulación de PTH no se observó diferencia significativa en la fosforilación pY507 de Lyn. Sin embargo, se detectó de manera aislada, la disminución de la fosforilación pY507, indicando para la proteína

Lyn un posible proceso de activación celular en respuesta a la estimulación de la PTH.

Aunque estos resultados no permiten establecer una conclusión contundente con respecto al efecto de la PTH en la señalización intracelular del linfocito B. Los resultados aislados pueden ser un indicio de los posibles efectos que se están generando, lo que lleva a plantear la modificación de condiciones y estrategias experimentales para analizar este proceso de activación celular.

CONCLUSIONES

Los hallazgos en esta investigación establecen una línea de base de la expresión de PTH1R en linfocitos B de HC (alrededor del 5%) y sugieren que cuando se expresa en altos niveles, podría ser un biomarcador útil en LES y un marcador de actividad de enfermedad en pSS.

La distribución aumentada de las subpoblaciones Bm2 y Bm2' que expresan PTH1R es coherente con las anomalías de distribución de estas células observadas en SSp.

Los efectos de la PTH sobre la modulación de subpoblaciones de linfocitos B sugieren un papel potencial de la hormona en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

LIMITACIONES

El tamaño de la muestra en el estudio observacional es pequeño y se deben estudiar muestras más grandes para que los resultados sean más generalizables. Además de realizar estudios de asociación para establecer el riesgo por la expresión elevada del receptor PTH1R y el desarrollo de EAs

La evaluación de los efectos de la PTH en los linfocitos B inicialmente se esperaba realizarla en células obtenidas de amígdalas de niños llevados a amigdalectomía, así como en linfocitos B obtenidos de pacientes con EAs, sin embargo, debido a la suspensión durante más de 6 meses de procedimientos electivos a causa de la pandemia, no fue posible desarrollarlas. Por esta razón, se decidió verificar los efectos de la PTH, en un modelo *in vitro*, sobre una línea establecida de linfocitos B que expresara el receptor.

La clasificación basada en la expresión IgD y CD38 es menos específica en sangre periférica y no logra separar algunas células: células B transicionales (IgD⁺ CD38^{hi}) de las células pre-CG (Bm2'), células vírgenes en reposo (Bm1) de células de memoria sin cambio de isotipo (IgD⁺).

En este estudio no se analizaron los niveles de Calcio, PTH o vitamina D y su posible relación con la expresión del receptor.

PERSPECTIVAS

Para entender los cambios en la expresión del receptor de la PTH (PTH1R) se sugiere evaluar la presencia de variantes en el promotor del receptor, alteraciones en la metilación de las islas CpG y análisis de variaciones en la expresión de miRNA que pudieran estar relacionados con la sobreexpresión del receptor descrita en los pacientes.

Se sugiere, además, analizar otras proteínas adicionales involucradas en la señalización intracelular de la activación del linfocito B (Como Syk) para evaluar los efectos de la estimulación con PTH en estas células, y considerar realizar la detección de proteínas fosforiladas por medio de citometría de flujo, ya que se ha demostrado que los protocolos de “PhosphoFLoW” presentan una menor variabilidad y mayor sensibilidad que la determinación por Western blot (76).

Se espera replicar los experimentos *in vitro* en células de pacientes para establecer conclusiones más contundentes y caracterizar modelos animales de autoinmunidad e hiperparatiroidismo con relación a la expresión del receptor de la PTH, para continuar evaluando la relación de este eje inmuno-endocrino y la posibilidad de proponer futuras hipótesis de blancos moleculares que puedan ser modificados por intervenciones farmacológicas y que tengan como objetivo la disminución de la activación patológica de los linfocitos B en la autoinmunidad.

A nivel clínico, es importante relacionar la expresión del receptor de la PTH (PTH1R) con la presencia de características de autoinmunidad en pacientes con hiperparatiroidismo y realizar un seguimiento a la evolución de estas condiciones posterior a la paratiroidectomía.

REFERENCIAS

1. Abul K AM, Andrew H. Lichtman MD P, Shiv Pillai MBBS P. Celular and Molecular Immunology. 9th ed. Procedia Engineering. Elsevier; 2017. 1–608 p.
2. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. Journal of Autoimmunity. 2010;34(3).
3. Chauhan R, Raina V, Nandi SP. Prevalence of autoimmune diseases and its challenges in diagnosis. Critical Reviews in Immunology. 2019;39(3).
4. Lernmark Å. Autoimmune diseases: Are markers ready for prediction? Vol. 108, Journal of Clinical Investigation. 2001.
5. Youinou P, Dueymes M, Shoenfeld Y. AUTOANTIBODY SUBCLASSES. Autoantibodies. 2007 Jan 1;61–7.
6. Pasoto SG, Martins VA de O, Bonfa E. Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: Links and risks. Open Access Rheumatology: Research and Reviews. 2019;11.
7. Al-Hashimi I, Khuder S, Haghighat N, Zipp M. Frequency and predictive value of the clinical manifestations in Sjögren's syndrome. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2001;30(1).
8. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. Arthritis and Rheumatology. 2017;69(1).

9. Watad A, Azrielant S, Bragazzi NL, Sharif K, David P, Katz I, et al. Seasonality and autoimmune diseases: The contribution of the four seasons to the mosaic of autoimmunity. Vol. 82, *Journal of Autoimmunity*. 2017.
10. Coronel-Restrepo N, Posso-Osorio I, Naranjo-Escobar J, Tobón GJ. Autoimmune diseases and their relation with immunological, neurological and endocrinological axes. Vol. 16, *Autoimmunity Reviews*. 2017.
11. Procaccini C, Pucino V, de Rosa VD, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
12. Verburg-van Kemenade BML, Cohen N, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment. *Developmental and Comparative Immunology*. 2017;66.
13. Cutolo M, Straub RH. Sex steroids and autoimmune rheumatic diseases: state of the art. Vol. 16, *Nature Reviews Rheumatology*. 2020.
14. Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. Vol. 33, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2019.
15. Vadacca M, Margiotta DPE, Navarini L, Afeltra A. Leptin in immunorheumatological diseases. Vol. 8, *Cellular and Molecular Immunology*. 2011.
16. del Mar Montesinos M, Pellizas C. Thyroid hormone action on innate immunity. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology*. 2019.
17. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. 2017.
18. Khan M, Jose A, Sharma S. *Physiology, Parathyroid Hormone*. Treasure Island. 2021.

19. PTH Gene - GeneCards | PTHY Protein | PTHY Antibody [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTH>
20. Kumar R, Thompson JR. The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. Vol. 22, Journal of the American Society of Nephrology. 2011.
21. Tovey SC, Dedos SG, Taylor CW. Signalling from parathyroid hormone. Biochemical Society Transactions. 2006;34(4).
22. PTH2R Gene - GeneCards | PTH2R Protein | PTH2R Antibody [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTH2R>
23. PTH1R Gene - GeneCards | PTH1R Protein | PTH1R Antibody [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTH1R>
24. Perry HM, Chappel JC, Bellorin-Font E. Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes. Journal of Biological Chemistry. 1984;259(9).
25. Geara AS, Castellanos MR, Bassil C, Schuller-Levis G, Park E, Smith M, et al. Effects of parathyroid hormone on immune function. Vol. 2010, Clinical and Developmental Immunology. 2010.
26. Abate EG, Clarke BL. Review of hypoparathyroidism. Vol. 7, Frontiers in Endocrinology. 2017.
27. Alexiewicz JM, Klinger M, Pitts TO, Gaciong Z, Linker-Israeli M, Massry SG. Parathyroid hormone inhibits B cell proliferation: Implications in chronic renal failure. Journal of the American Society of Nephrology. 1990;1(3).

28. Kaneko T, Osono E, Hayama N, Lino Y, Terashi A. T-cell activation modified by parathyroid hormone (PTH) in patients with end-stage renal disease. *Clinical Nephrology*. 1997;48(6).
29. Wang JC, Steier W, Aung MK, Tobin MS. Primary hyperparathyroidism and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1978;42(4).
30. Alliot C, Barrios M, Brunel M. Primary hyperparathyroidism and lymphoproliferative diseases: Three case reports. *Hematology*. 2001;6(1).
31. Arnulf B, Bengoufa D, Sarfati E, Toubert ME, Meignin V, Brouet JC, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy in patients with primary hyperparathyroidism: A prospective study. *Archives of Internal Medicine*. 2002;162(4).
32. Rosen C, Segal H, Hartz CE, oz F, Carlton E. Primary Hyperparathyroidism in an Elderly Patient with Multiple Myeloma. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40(7).
33. Goto S, Yoshioka M, Nagai K, Abe A, Murakawa E, Yamazaki N, et al. Primary Hyperparathyroidism Associated with Multiple Myeloma. *Internal Medicine*. 1995;34(10).
34. Galvão LD, Lima I v., Santos L, Santiago MB. Hiperparatireoidismo primário em paciente com lúpus eritematoso sistêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2004;48(4).
35. A. Canas C. Total Recovery from Monoclonal Gammopathy and Autoimmune Phenomena After Parathyroidectomy. *The Open Rheumatology Journal*. 2012;6(1).
36. Benekli M, Savas MC, Erdem Y, Yalcin AU, Yasavul U, Turgan C, et al. Primary hyperparathyroidism in a patient with systemic lupus erythematosus-antiphospholipid syndrome [1]. Vol. 79, *Nephron*. 1998.

37. Ralston SH, Fraser WD, Jankowski J, Richards IM, Cowan RA, Capell HA, et al. Hypercalcaemia in rheumatoid arthritis revisited. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1990;49(1).
38. Maida MJ, Praveen E, Crimmins SR, Swift GL. Coeliac disease and primary hyperparathyroidism: An association? *Postgraduate Medical Journal*. 2006;82(974).
39. Gannage MH, Abikaram G, Nasr F, Awada H. Osteomalacia secondary to celiac disease, primary hyperparathyroidism, and graves' disease. *American Journal of the Medical Sciences*. 1998;315(2).
40. Barut I, Tarhan OR, Cerci C, Karahan N. Hypercalcemia syndrome. Coexisting hyperthyroidism, primary hyperparathyroidism and cancer of the gallbladder. *Saudi Medical Journal*. 2005;26(7).
41. Triggiani V, Guastamacchia E, Lolli I, Troccoli G, Resta F, Sabbà C, et al. Association of a wide invasive malignant thymoma with myasthenia gravis and primary hyperparathyroidism due to parathyroid adenoma: Case report and review of the literature. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2006;28(2).
42. Kinoshita M, Ikeda K, Iwasaki Y, Saito E, Takamiya K. A case with polymyositis associated with primary hyperparathyroidism. *Clinical Neurology*. 1989;29(4).
43. Strunge P. Co-existing polymyositis and primary hyperparathyroidism. *Dan Med Bull*. 1970;17(7).
44. Liozon É, Loustaud-Ratti V, Soria P, Bezanahary H, Fauchais AL, Nadalon S, et al. Disease associations in 250 patients with temporal (giant cell) arteritis. *Presse Medicale*. 2004;33(19 I).
45. Bhadada SK, Sridhar S, Ahluwalia J, Bhansali A, Malhotra P, Behera A, et al. Anemia and thrombocytopenia improves after curative parathyroidectomy in a

- patient of primary hyperparathyroidism (PHPT). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012;97(5).
46. Clubb JS, Posen S, Neale FC. Disappearance of a Serum Paraprotein After Parathyroidectomy. *Archives of Internal Medicine*. 1964;114(5).
 47. Cañas CA, Bonilla-Abadía F, Anaya JM, Tobón GJ. Is primary hyperparathyroidism a pathogenic factor in some conditions mediated by B lymphocytes hyperactivity? *Medical Hypotheses*. 2013;81(1).
 48. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 2012;64(8).
 49. Gladman DD, Ibañez D, Urowltz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *Journal of Rheumatology*. 2002;29(2).
 50. Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): A user guide. *RMD Open*. 2015;1(1).
 51. van Belle K, Herman J, Boon L, Waer M, Sprangers B, Louat T. Comparative in Vitro Immune Stimulation Analysis of Primary Human B Cells and B Cell Lines. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016.
 52. Islam AK. Advances in the diagnosis and the management of primary hyperparathyroidism. Vol. 12, *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2021.
 53. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jan 11];3(OCT). Available from: [/pmc/articles/PMC3467643/](https://pmc/articles/PMC3467643/)

54. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;180(1).
55. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome. *The Journal of Immunology*. 2001;167(7).
56. Lee KH, Ahn BS, Cha D, Jang WW, Choi E, Park S, et al. Understanding the immunopathogenesis of autoimmune diseases by animal studies using gene modulation: A comprehensive review. Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. 2020.
57. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. Vol. 278, *Journal of Internal Medicine*. 2015.
58. Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. Vol. 33, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2019.
59. Legorreta-Haquet MV, Flores-Fernández R, Blanco-Favela F, Fuentes-Pananá EM, Chávez-Sánchez L, Hernández-González R, et al. Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013.
60. Cutolo M, Straub RH. Sex steroids and autoimmune rheumatic diseases: state of the art. Vol. 16, *Nature Reviews Rheumatology*. 2020.
61. Dragin N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, Biferi MG, Berthault C, Serraf A, et al. Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(4).

62. Wolff ASB, Braun S, Husebye ES, Oftedal BE. B cells and autoantibodies in aire deficiency. Vol. 9, Biomedicines. 2021.
63. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: An autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunology*. 2001;2(9).
64. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human b cell and plasma cell populations. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. 2019.
65. Binard A, le Pottier L, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009;68(9).
66. Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis [Internet]*. 2013 [cited 2022 Jan 20];2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24187614/>
67. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. *Frontiers in Immunology*. 2018 Oct 8;9(OCT):2285.
68. Ospina FE, Betancur JF, Suso JP, Muñoz-Buitron E, Cañas CA, Tobón GJ. Role of the cytokine BAFF in autoimmune diseases: Physiopathology and therapeutic targets. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*. 2016 Jul 1;23(3):177–94.
69. Boneparth A, Woods M, Huang W, Akerman M, Lesser M, Davidson A. The effect of baff inhibition on autoreactive B-cell selection in murine systemic lupus erythematosus. *Molecular Medicine*. 2016;22.
70. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. Vol. 12, *Nature Reviews Immunology*. 2012.

71. Guo W, Smith D, Aviszus K, Detanico T, Heiser RA, Wysocki LJ. Somatic hypermutation as a generator of antinuclear antibodies in a murine model of systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(10).
72. Mietzner B, Tsuiji M, Scheid J, Velinzon K, Tiller T, Abraham K, et al. Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2022 Jan 19];105(28):9727. Available from: [/pmc/articles/PMC2474524/](#)
73. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* [Internet]. 2007 Feb 23 [cited 2022 Jan 19];26(2):205. Available from: [/pmc/articles/PMC1839941/](#)
74. de Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2022 Jan 19];15(3):137. Available from: [/pmc/articles/PMC4399774/](#)
75. Judith A. Owen, Jenni Punt SAS. *Kuby Immunology Seventh Edition*. Susan Winslow. 2017.
76. Rip J, de Bruijn MJW, Kaptein A, Hendriks RW, Corneth OBJ. Phosphoflow Protocol for Signaling Studies in Human and Murine B Cell Subpopulations. *The Journal of Immunology*. 2020;204(10).
77. Barber MRW, Drenkard C, Falasinnu T, Hoi A, Mak A, Kow NY, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. Vol. 17, *Nature Reviews Rheumatology*. 2021.

ANEXOS

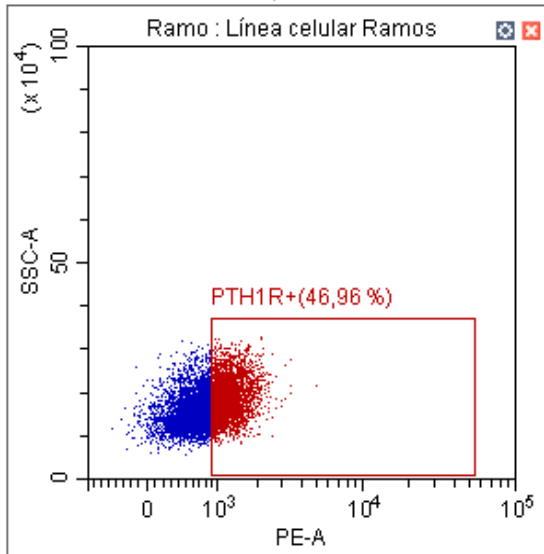
Anexo 1. Distribución de subpoblaciones celulares en las cohortes

Subpoblaciones de linfocitos B	Distribución de subpoblaciones celulares Mediana (IQR)				<i>p</i> valor ^a	
	HC	SSp	LES	global	HC vs SLE	HC vs pSS
Bm1	15.5 (8.8)	10.5 (12.9)	12.8 (19.2)	0.112	-	-
Bm2	48.7 (16.9)	54.5 (21.5)	34.2 (29.0)	0.017	0.138	0.504
Bm2'	3.1 (5.9)	8.0 (12.8)	0.47 (11.3)	0.023	0.460	0.194
Bm3-4	0.8 (1.0)	0.6 (0.7)	1.6 (2.7)	0.258	-	-
eBm5	11.4 (7.4)	8.3 (6.4)	14.0 (11.3)	0.050	-	-
Bm5	13.4 (6.1)	9.8 (9.0)	17.1 (16.7)	0.037	0.624	0.199

a Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. Se consideraron valores significativos con $p < 0.05$

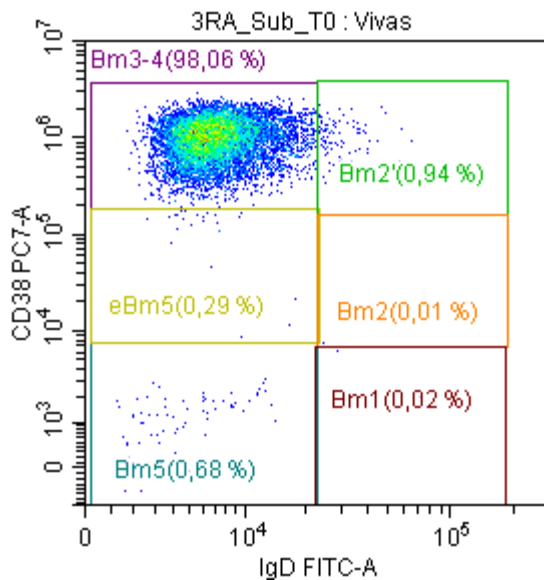
Anexo 2. Caracterización celular de línea Ramos (RA1)

a. Expresión del receptor para la PTH (PTH1R)



Porcentaje de células de la línea celular Ramos (RA1) que expresan el receptor PTH1R, evaluado por citometría de flujo

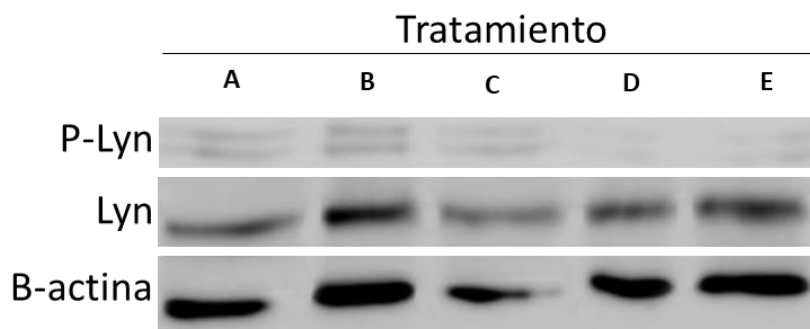
b. Distribución fenotípica



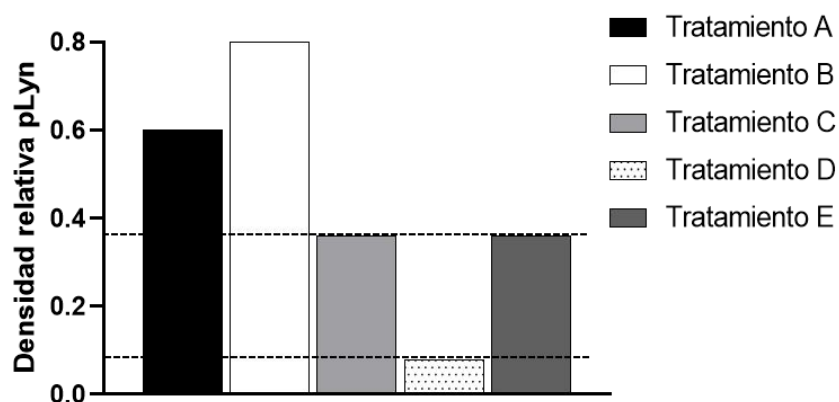
Fenotipo de células de la línea celular Ramos (RA1), caracterizado por la expresión de IgD y CD38 por citometría de flujo

Anexo 3. Efecto aislado de la PTH en la activación del linfocito B

a.



b.



Linfocitos B de línea celular Ramos cultivadas y estimuladas con tratamiento A (sin estímulo), tratamiento B (CpG 0.1 μ M), tratamiento C (CpG 0.1 μ M + PTH 0.5 ng/mL), tratamiento D (CpG 0.1 μ M + PTH 2 ng/mL) y tratamiento E (CpG 0.1 μ M + PTH 8 ng/mL), durante 4 horas. Los niveles de proteínas fueron medidos con Western blot (a). Se representan los valores obtenidos para una réplica experimental en donde se observó una disminución (Línea punteada) en la fosforilación de Lyn con los estímulos de PTH (b)

Anexo 4. Aceptación de abstract en presentación oral Congreso Internacional de Lupus y Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA) 2021



Dear Dr. Gabriel Tobón,

Thank you for submitting an abstract to the **14th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus (LUPUS 2021) & 6th International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA)** scheduled to take place in a virtual format **October 6-9, 2021**.

On behalf of the Scientific Program Committee, we are pleased to inform you that your abstract has been accepted for **ORAL PRESENTATION** at the Congress.

Abstract no: 233

Abstract title: EFFECTS OF THE PARATHORMONE RECEPTOR EXPRESSION ON B CELLS AND THE BIOLOGICAL EFFECTS OF THE HORMONE ON CELL FUNCTIONING IN AUTOIMMUNE DISEASES

YOUR SCHEDULING

Your presentation will be **PRE-RECORDED** and streamed live on the day of the session. After your pre-recorded video has been streamed live, each Oral Presenter together with the session moderators will be required to join a live Q&A discussion.

You will be allocated **6 minutes for your pre-recorded presentation and will have 4 minutes for Live Q&A discussion**.

In the coming weeks you will receive details about your session date&time and additional information on how to book a recording session for your presentation.

Recordings will begin in August 2021 and the deadline to complete the recordings will be 2 September 2021.

CONFIRMATION OF ATTENDANCE AND REGISTRATION FOR THE CONGRESS

The presenting author must confirm his/her attendance by registering for the Congress.

Please register by 6 August 2021 in order to secure your place in the Scientific Program.
FURTHER INFORMATION

LUPUS CORA 2021 promises to be a great event and we look forward to seeing you virtually!

Yours sincerely,

LUPUS CORA 2021 Congress Secretariat

Anexo 5. Carta de reconocimiento “Top 5 CORA 2021”



Dear Dr. Gabriel Tobón,

On behalf of the CORA Congress Chairs Prof. Andrea Doria, Prof. Piercarlo Sarzi Puttini, Prof. Zoltan Szekanecz and Honorary Chair Prof. Yehuda Shoenfeld, we would like to **congratulate** you on being one of the top 5 abstracts submitted to CORA 2021 and winning the **Top 5 CORA 2021 Abstracts** prize for your work below.

Abstract Number: 233

Abstract Topic: CORA Topics / ASL06 BIOMARKERS IN AUTOIMMUNE RHEUMATIC CONDITIONS

Abstract Title: EFFECTS OF THE PARATHORMONE RECEPTOR EXPRESSION ON B CELLS AND THE BIOLOGICAL EFFECTS OF THE HORMONE ON CELL FUNCTIONING IN AUTOIMMUNE DISEASES

The award in the sum of ---- is awarded to the Top 5 best CORA abstracts submitted to the **6th International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA)**. The funds will be transferred after the joint congress and are dependent on having your registration paid.

The Award will be announced at the **Opening Ceremony & Keynote Lecture** session on Wednesday, October 6, 2021, 12:15-13:45 CEST.

Please provide us with your short bio (a couple sentences) and a photo in good quality (jpg file) that will be advertised on our website as well as when the award is announced. As the congress is fast approaching, please provide me with the above by **Friday, September 17** so we can create the appropriate congress materials.

If you have any questions, please don't hesitate to contact me.

Congratulations once again!
Kind regards,
Kristina

LUPUS CORA 2021 Congress Secretariat
KRISTINA STARR
Senior Program Coordinator
Rue François-Versonnex 7, 1207 Geneva, Switzerland
E: kstarr@kenes.com T: +41 22 908 0488 | F: +41 22 906 9140

Anexo 6. Publicación en revista científica

Los resultados del primer objetivo fueron consignados en un manuscrito aceptado y publicado en la revista “Rheumatology” (Oxford) con un factor de impacto de 7.58 y clasificada como Q1

RHEUMATOLOGY

Letter to the Editor (Other)

Rheumatology 2021;00:1–3
doi:10.1093/rheumatology/keab693
Advance access publication 16 September 2021

Expression of parathormone receptor on B-lymphocytes in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome

Rheumatology key message

- Expression of parathormone receptor on B-lymphocytes has a potential role as a biomarker in autoimmunity.

DEAR EDITOR, Autoimmune diseases are complex conditions where multiple aetiological factors, including genetics, epigenetics, environment, immunologic and hormonal, may converge. Several hormones are of interest in autoimmunity, such as oestrogens or progesterone, which have a described role in immune system function [1]. Clinical cases have shown association of primary hyperparathyroidism with development of monoclonal gammopathies or autoimmune diseases, with clinical and biological recovery after parathyroidectomy [2]. Previously, our group proposed that high levels of PTH could alter the normal function of B-lymphocytes and trigger the development of autoimmunity mediated by B-lymphocytes hyperactivity [3].

To evaluate the effects of PTH on B-lymphocytes, we determined the expression of PTH receptor (PTH1R) on B-lymphocytes from patients with SLE and primary Sjögren's syndrome (pSS), as well as healthy controls (HC). This staining was made by evaluating B-cell sub-

(eBm5) and IgD⁺CD38⁺ (Bm5) (Fig. 1A) [4]. We correlated PTH1R expression with scores on disease activity indexes at the time of the blood sample: SLEDAI–2K for SLE and EULAR Sjögren's syndrome disease activity index for pSS. Shapiro–Wilk test was used to evaluate normality distribution, Kruskal–Wallis for comparisons between groups and Spearman's rank for correlations. P -values ≤ 0.05 were considered significant.

A total of 53 cases were included, of which 14 had SLE [14, 100% were women, median age 30 years interquartile range (IQR 33)], 20 had pSS (17, 85% women; 66 years IQR 16) and 20 HC (17, 85% women; 28 years IQR 5). Expression of PTH1R was significantly higher on B-lymphocytes from SLE (14.5% IQR 16.2) compared with HC (5.0% IQR 3.1)

($P = 0.003$) and pSS (4.6% IQR 9.3) ($P = 0.007$). Age between groups was compared: global P -value: 0.000, HC vs SLE, $P = 1$; HC vs pSS: $P = 0.000$; SLE vs pSS: $P = 0.009$; however, this difference was not correlated with the expression of PTH1R between groups (Spearman's Rho: $r = -0.43$; $P = 0.756$). Some patients with pSS showed levels of PTH1R expression as high as SLE patients ($n = 6$, 10.3–18.7%), and showed a significant correlation with EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (median 3 IQR 6, $r = 0.490$, $P = 0.028$); the contrary happened in SLE, where PTH1R expression–SLEDAI were not correlated (median 2 IQR 8, $r = -0.123$, $P = 0.676$).

The peripheral B-cell subsets did not show differences in their distribution when compared between pSS and SLE with HC (data not shown). However, the distribution of the subsets that expressed PTH1R showed a difference in pSS compared with HC (Fig. 1B and C). The distribution of the Bm1 subset expressing PTH1R was significantly lower in pSS (20.2%) and SLE (19.6%) than

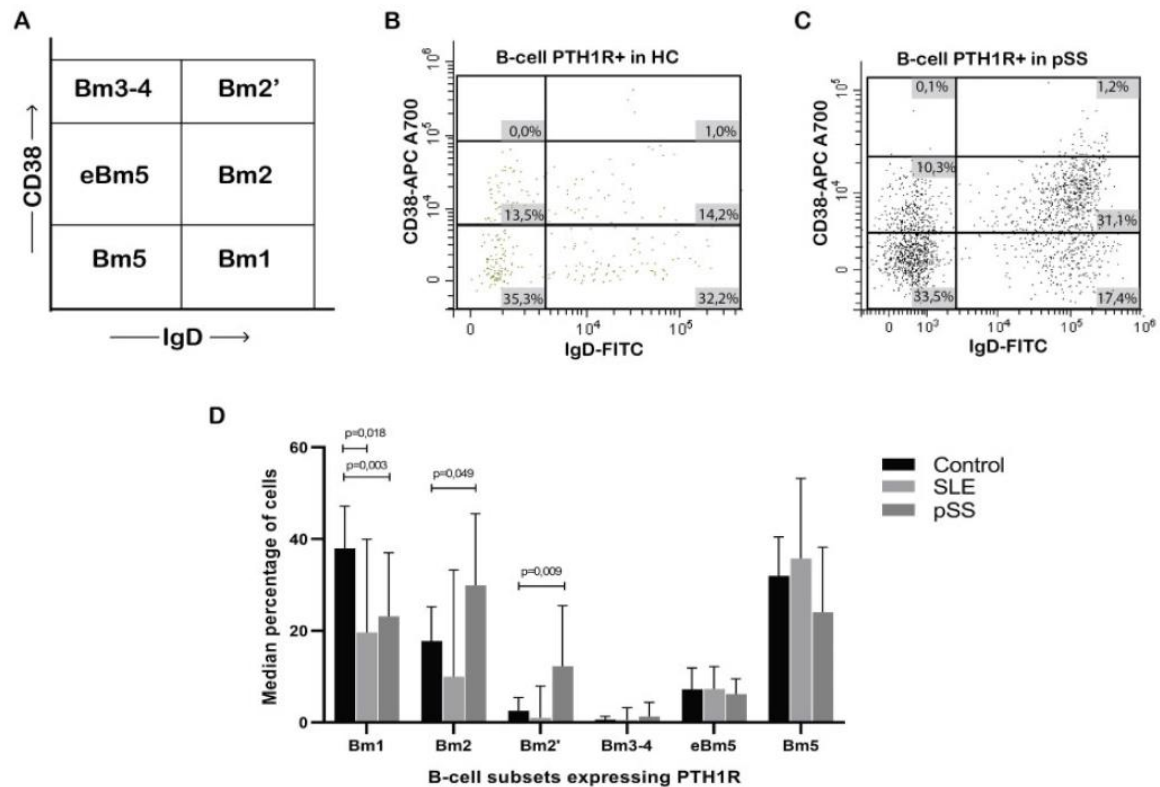
sets and PTH1R expression from peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry using fluorescently labelled and specific antibodies for CD19 (APC-A700-conjugated, J3119; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), CD38 (PECy7-conjugated, LS198-4-3; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), IgD (FITC-conjugated, IgD26; MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and PTH1R [primary rabbit anti-PTH1R human; Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany; and secondary goat anti-rabbit IgG (H+L) PE-conjugated; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]. Data were collected on a CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) and analysed using CytExpert software. Six B-cell subsets were characterized: IgD⁺CD38⁻ (Bm1), IgD⁺CD38⁺ (Bm2), IgD⁺CD38^{Hi} (Bm2'), IgD⁻CD38^{Hi} (Bm3-4), IgD⁻CD38⁺

HC (39%), while Bm2 (30.5%), and Bm2' (8.7%) were higher in pSS compared with HC (18% and 1.7%, respectively). The distribution of Bm3-4 (0.4%, 0.5%, 0.2%), eBm5 (6.4%, 7.3%, 6.1%) and Bm5 (31.5%, 35.8%, 21.2%) that expressed PTH1R were similar between HC, SLE and pSS, respectively (Fig. 1D).

Perry *et al.* described the presence of PTH1R in circulating human lymphocytes [5]. However, levels of receptor expression on B-lymphocytes have not yet been characterized. Our findings establish a baseline of PTH1R expression on B-lymphocytes of HC and suggest that when expressed at high levels, it could be a useful biomarker in SLE and a disease activity marker in pSS.

Furthermore, despite previously reports suggesting an increased distribution of Bm2 and Bm2' subsets as a diagnostic feature in pSS patients [6], we obtained similar

Fig. 1 Patterns of distribution of peripheral B-cells in subsets that expressed PTH1R



B-cell subsets based on membrane IgD and CD38 expression: Bm1, naive cells; Bm2 and Bm2', germinal centre founder cells; Bm3-4, germinal centre cells; eBm5 and Bm5, memory cells (A). Distribution of subsets that expressed PTH1R in HC (3.28%) (B) and pSS (18.65%) (C). Percentage of cells expressing PTH1R compared between subsets and cohorts ($P < 0.05$) (D). HC: healthy controls; pSS: primary Sjögren's syndrome.

distribution results but no significant differences in the total subset of B-cells were seen. In contrast and interestingly, these differences were observed in the subsets of B-cells expressing PTH1R, being consistent with the distribution abnormalities of these cells seen in pSS; also, those subsets correspond to germinal centre founder cells [7], reflecting a stage of activation of the immune response that the overexpressed PTH1R signalling could enhance. These findings could explain the correlation with disease activity in pSS due to hyperactivation of peripheral B-lymphocytes.

In conclusion, high levels of PTH1R expression could be a useful biomarker in SLE, and the altered distribution of B-cell subsets expressing PTH1R could explain the correlated disease activity in pSS by the increased activation of B-lymphocytes. Our sample size is small, and bigger samples should be studied to make results more generalizable. In addition, the effects of PTH on B-cell functions need to be studied.

Acknowledgements

This study was approved by the Institutional Ethics Committee of Fundación Valle del Lili, protocol number

996. Informed consent was obtained from all the patients whose samples were used.

Funding: This work received a grant from the Announcement 807– 2018 for science, technology and innovation projects in health in 2018 (CT. 835-2018) by Ministry of Science, Technology and Innovation – Minciencias, Colombia (formerly Colciencias). The content of this manuscript is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of Minciencias.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Data availability statement

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

Lady J. Rios-Serna^{1,2}, Ivana Nieto-Aristizábal³, Ingrid Ruiz-Ordoñez³, Tatiana Mendez-Rayó⁴, Iván Posso-Osorio³, Jhon García³, Erika P. Navarro⁴, María Claudia Barrera¹, David Aguirre-Valencia^{1,5}, Carlos A. Cañas^{1,5} and Gabriel J. Tobón^{1,5}

¹CIRAT: Centro de Investigación en Reumatología, Autoinmunidad y Medicina Traslacional, Universidad Icesi,

²Facultad de Salud, Posgrado Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle, ³Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Valle del Lili, ⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Icesi and ⁵Unidad de Reumatología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

Accepted 01 September 2021

Correspondence to: Gabriel J. Tobón, Universidad Icesi, CIRAT: Centro de Investigación en Reumatología, Autoinmunidad y Medicina Traslacional, Calle 18 No. 122-135, Cali 760031, Colombia. E-mail: gjtobon@icesi.edu.co

References

- 1 Coronel-Restrepo N, Posso-Osorio I, Naranjo-Escobar J, Tobón GJ. Autoimmune diseases and their relation with immunological, neurological and endocrinological axes. *Autoimmun Rev* 2017;16:684–92.
- 2 Canas CA, Echeverri AF, Anaya J-M. Total recovery from monoclonal gammopathy and autoimmune phenomena

after parathyroidectomy. *Open Rheumatol J* 2012;6: 180–2.

- 3 Cañas CA, Bonilla-Abadía F, Anaya JM, Tobón GJ. Is primary hyperparathyroidism a pathogenic factor in some conditions mediated by B lymphocytes hyperactivity? *Med Hypotheses* 2013;81:111–3.
- 4 Pascual V, Liu YJ, Magalski A *et al.* Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994;180:329–39.
- 5 Perry HM, Chappel JC, Bellorin-Font E *et al.* Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1984;259:5531–5.
- 6 Binard A, Le Pottier L, Devauchelle-Pensec V *et al.* Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Ann Rheum Dis* 2009;68:1447–52.
- 7 Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol* 2001;167:3610–8.