

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

10

FACULTAD DE MEDICINA

2es.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

AUTOANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA EN LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO: FRECUENCIA Y CORRELACION CON LA PROLACTINEMIA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :

DR. ALFREDO LEAÑOS MIRANDA

ASESOR: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA



IMSS

MEXICO, D. F.

259053

FEBRERO DE 1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco sinceramente a:

Dr. Francisco Blanco Favela.

Por su valiosa dirección y asesoría para la realización de esta tesis, así como también por los consejos recibidos.

A mis sinodales por su apoyo, asesoría y estímulos recibidos.

Mi enorme gratitud a la Química Dalila Pascoe Lira, por su amistad y valiosa colaboración y sus acertados comentarios durante mi estancia en el laboratorio.

A todo el personal del Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por el apoyo recibido para la realización del presente trabajo.

A todos los pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por su colaboración desinteresada y entusiasta que accedieron participar en esta investigación, cuya meta no se hubiera alcanzado sin su ayuda. Muchas gracias.

Dedico este trabajo muy especialmente a:

Mi madre Ana Miranda Chávez a la que le debo todo lo que soy.

Mi padre Ernesto Leños Espinoza que a pesar de que no se encuentra conmigo, su recuerdo siempre me acompaña a todas partes al igual que sus consejos.

Mi hermana Blanca Leños Miranda por su apoyo de siempre y ayuda incondicional.

A mis hermanos.

A mis sobrinos.

A JOC, amigos, maestros, compañeros con los cuales compartí momentos inolvidables.

CONTENIDO

Resumen	1
Antecedentes	3
Justificación	9
Planteamiento del problema	9
Hipótesis	11
Objetivos	11
Sujetos, material y métodos	
Sitio del estudio	12
Diseño de la investigación	12
Diseño de la muestra	13
Tamaño de muestra	14
Variables	15
Análisis de datos	17
Resultados	19
Discusión	24
Conclusiones	29
Tablas	30
Figuras	38
Anexos	64
Bibliografía	73

GLOSARIO

BCR	Bromocriptina.
CPM	Cuentas por minuto.
CT	Cuentas totales.
DE	Desviación estándar.
HPRL	Hiperprolactinemia.
IL	Interleucina.
IRMA	Inmuno-radio-ensayo.
kDa	Kilodalton.
LES	Lupus eritematoso sistémico.
NPRL	Normoprolactinemia.
PBS	Amortiguador fosfato salino.
PEG	Polietilenglicol (8,000)
PRL	Prolactina.
RIA	Radio inmuno-ensayo.
r_s	Coefficiente de correlación de Spearman.
rpm	Revoluciones por minuto.
SLEDAI	Indice de la actividad de la enfermedad en lupus eritematoso sistémico.

RESUMEN

Objetivos. Determinar en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES): 1) la frecuencia de autoanticuerpos anti-prolactina (Ac-PRL), 2) la correlación entre los títulos de Ac-PRL y la prolactinemia, 3) la asociación entre la presencia de Ac-PRL y la actividad lúpica y 4) la correlación entre los títulos de Ac-PRL y la actividad lúpica.

Diseño. Estudio transversal (descriptivo para objetivos 1, 2 y 4, y comparativo para el objetivo 3).

Sitio del estudio. Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría y el Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Pacientes. 259 pacientes (242 mujeres) consecutivos (muestreo no aleatorio), ≥ 16 años de edad con criterios del Colegio Americano de Reumatología para LES, cualesquiera que fuera el tiempo de evolución, actividad y tratamiento, atendidos en la clínica de lupus entre septiembre, 1996 y abril de 1997.

Mediciones. Se realizó interrogatorio y exploración física, la actividad lúpica fue evaluada con el índice de actividad de la enfermedad en LES (SLEDAI, ≥ 1 punto se considero activo), determinación sérica basal de prolactina, presencia y títulos de Ac-PRL. Los coeficientes de variación intra e interensayo de todas las pruebas fueron menores del 8 %.

Resultados. En 13/259 (5 %) tuvieron Ac-PRL en base a: i) la proporción de PRL sérica unida a IgG por IRMA después de haber sido inmunoprecipitada con proteína A acoplada a sefarosa fue mayor a la media + 3 DE del valor de 24 mujeres sanas (0.35 ± 0.4 %), 14 con normoprolactinemia [NPRL] < 20 ng/ml y 10 embarazadas con hiperprolactinemia [HPRL] > 20 ng/ml, ii) la filtración en gel mostró que la mayor parte de la PRL sérica (65.8 ± 11.8 %) era una macroprolactina (big-big PRL) que eluyo en la posición del peso molecular de la IgG (150 kDa) y iii) la proporción de unión de la PRL sérica a columnas con proteína A y G fue elevada (76.1 ± 10 %). La frecuencia de Ac-PRL en NPRL fue de 0 % (0/218) y en HPRL 31.7 % (13/41). Con HPRL secundaria "inducida por drogas" 2/12 (14.3 %) y con HPRL idiopática 11/27 (40.7 %). Hubo una correlación positiva entre los títulos de Ac-PRL y la PRL sérica ($r_s=0.98$, $p=0.0001$). En 110 pacientes (42.5 %) había actividad lúpica y la frecuencia de Ac-PRL entre activos y no activos no fue significativa (5.5 % vs. 4.7 %, $p=0.99$); de las variables probadas sólo los niveles elevados de PRL

mostró ser un factor independiente asociado a la actividad lúpica ($p=0.024$). Hubo una correlación negativa pero no significativa entre los títulos de Ac-PRL y el SLEDAI ($r_s = -0.16$, $p=0.59$). Los pacientes con Ac-PRL tenían niveles de PRL más elevados (33.2 ± 13.8 ng/ml vs. 11.6 ± 13.2 ng/ml, $p=0.0001$) y todos con HPRL (100 % vs. 11.4 %, $p=0.00001$).

Conclusiones. Se demostró la presencia de Ac-PRL en un subgrupo de pacientes con LES, los cuales fueron detectados como una macroprolactina de ~ 150 kDa (big-big PRL), su frecuencia fue alta en pacientes con HPRL secundaria y aún mayor con HPRL de causa no identificada (HPRL idiopática). La presencia de Ac-PRL se asoció al estado hiperprolactinémico y sus títulos correlacionan en forma positiva con la prolactinemia. El aumento en los niveles séricos de PRL se relaciona a la actividad lúpica pero no se encontró relación entre los Ac-PRL y la actividad lúpica.

ANTECEDENTES

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmune compleja, es más frecuente en mujeres (relación mujeres/hombres 9:1) y más común durante la edad reproductiva (1), este predominio al sexo femenino ha sido atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de los estrógenos (2). El LES se caracteriza por anomalías tanto en los linfocitos B como T, especialmente durante la actividad de la enfermedad causando una exagerada producción de autoanticuerpos. El suero de pacientes con LES se caracteriza por la reactividad a una gran variedad de autoantígenos, particularmente a nucleoproteínas, entre estos autoanticuerpos, aquellos que unen DNA, Sm, RNP, Ro, La e histonas han sido extensamente estudiados. Algunos de estos autoanticuerpos como anti-dsDNA y anti-Sm han mostrado especificidad para LES, otros autoanticuerpos han sido asociados con manifestaciones particulares de la enfermedad. Los autoanticuerpos anti-Ro están asociados al LES cutáneo subagudo, lupus neonatal y lupus seronegativo. Los autoanticuerpos anti-La están presentes en los pacientes con lupus que tienen síndrome de Sjögren.

Las alteraciones en la respuesta inmune en el LES pueden ser debidas a factores genéticos, ambientales y hormonales. La hormona lactogénica de la hipófisis anterior prolactina (PRL), tiene potentes efectos sobre la respuesta inmune (3), se ha demostrado que exagera la actividad de la enfermedad en ratones hembras Nueva Zelanda negras X Nueva Zelanda blancas (NZB X NZW) que padecen una enfermedad similar al LES (4).

La actividad biológica de la PRL fue reconocida por primera vez en 1928, cuando al administrar extractos de hipófisis a conejas ooforectomizadas se les provocaba secreción láctea (5). Al momento actual se conocen más de 89 acciones diferentes de la PRL en animales vertebrados, desde peces a mamíferos que incluyen entre otras: osmorregulación, desarrollo y crecimiento, reproducción, metabolismo de carbohidratos y lípidos, secreción de mucinas y la más recientemente demostrada sobre el sistema inmune (6). El gen de la PRL se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y contiene 16 Kb que codifican para una proteína globular de una sola cadena de 198 aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa (7). La PRL se encuentra en varios tejidos de mamíferos y su síntesis ha sido demostrada en el corión humano, endometrio, en algunas líneas de células tumorales, en linfocitos T y B y en el sistema nervioso central (8-13).

La liberación de PRL por la hipófisis es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tiotropina, el péptido intestinal vasoactivo y neurolépticos e inhibida por dopamina y opiáceos. La interleucina (IL) 1 y probablemente otras citocinas participan en esta regulación (14-16).

La relación entre el péptido neuroendocrino PRL y el sistema inmune fue evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas sufría un proceso de atrofia inmediatamente después de realizarles hipofisectomía (17). Mucho después, Nagy y Berczi en 1978, publicaron su trabajo clásico acerca de la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas y que al administrarles PRL, hormona del crecimiento y lactógeno placentario se restablecía la reactividad inmunológica (18,19). En 1983 (20) se repitieron estos experimentos, pero esta vez utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de PRL, encontrándose exactamente los mismos resultados que con las ratas hipofisectomizadas, es decir, se inhibían las reacciones inmunes tanto celular como humoral (reacción de hipersensibilidad cutánea al dinitroclorobenceno, artritis por adyuvante, encefalitis alérgica experimental, formación de anticuerpos dirigidos contra eritrocitos de camero y a lipopolisacáridos bacterianos) (20,21).

La interrelación entre PRL y el sistema inmune ocurre a niveles celulares y moleculares. Las citocinas influyen en la secreción de PRL por células hipofisarias, la secreción de PRL es estimulada por IL-6 y suprimida por IL-1 (22,25). La IL-6 puede actuar como un regulador parácrino o endocrino de la secreción de PRL (22). Los linfocitos T y B expresan en la superficie celular receptores para PRL (26), los cuales están relacionados a la familia de los receptores de los factores de crecimiento y diferenciación (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y eritropoyetina) (27). Se ha demostrado también que la PRL es producida por linfocitos murinos, en una línea linfoblastoide humana de células B y en células humanas de leucemia mieloblástica aguda (11,12,28), sugiriendo que la PRL es un factor de proliferación autócrino o parácrino en los linfocitos.

Varios experimentos han demostrado aumento de la producción de autoanticuerpos en roedores hiperprolactinémicos (3,21,29,30). En ratones NZB X NZW F1 al inducirles hiperprolactinemia crónica por trasplante singénico de hipófisis se incrementa la albuminuria, aumentaron los complejos inmunes gp-70-anti-gp70, desarrollan hipergammaglobulinemia y tuvieron una mortalidad temprana secundaria a

nefritis por complejos inmunes (4). Recientemente se reportó que las mujeres con hiperprolactinemia tienen una frecuencia alta de autoanticuerpos, la presencia de por lo menos un autoanticuerpo a los 15 diferentes antígenos estudiados fue de 75.5 % (25/33), en contraste las mujeres sanas sin hiperprolactinemia no tuvieron autoanticuerpos (0/19) (31). Allen y cols. midieron PRL sérica en pacientes que se les solicitó anticuerpos antinucleares en un laboratorio de referencia de anticuerpos antinucleares, encontrando que la frecuencia de hiperprolactinemia fue mayor en sueros con anti-dsDNA en mujeres con ≤ 50 años de edad (20 % vs. 11 %, $p = 0.04$), como de anti-SSA/Ro-SSB/La en mujeres mayores de 50 años (21 % vs 14 %, $p = 0.03$) (32).

La hiperprolactinemia puede ser originada por: 1) embarazo, 2) prolactinoma, 3) macroadenomas hipofisarios no funcionales o tumores paraselares (meningioma, craneofaringioma) que comprimen la silla turca o hipotálamo, 4) drogas que estimulan la secreción de PRL (antagonistas dopaminérgicos e inhibidores de la recaptación de catecolaminas), 5) hipotiroidismo, 6) enfermedades de la pared torácica, 7) alteraciones hepáticas, 8) alteraciones renales e 9) hiperprolactinemia idiopática (cuando no se encuentra una causa explicable o probable).

El estado hiperprolactinéxico se ha relacionado a múltiples alteraciones autoinmunes, como tiroiditis, uveítis, hipofisitis linfocítica, insuficiencia suprarrenal autoinmune y LES (33-36). La asociación entre LES en hombres y niveles séricos elevados de PRL fue publicado en 1987 y corroborado por otros autores posteriormente (37-39). La ocurrencia de hiperprolactinemia (> 20 ng/ml) en pacientes con LES es un dato que se ha reportado consistentemente, su frecuencia oscila de 15.3 % a 30 % (40-44) y sólo Ostendorf (45) reportó una frecuencia de hiperprolactinemia del 2.2 %. En contraste sólo se espera que tengan hiperprolactinemia el 3 % de mujeres sanas entre los 14 a 43 años de edad (46).

En estudios realizados en modelos animales existe suficiente evidencia de que la PRL ejerce un efecto dañino en enfermedades autoinmunes (3,4,30), en cambio los reportes clínicos han aportado datos contradictorios acerca de la relación entre PRL y actividad lúpica. Algunos apoyan la asociación entre hiperprolactinemia y actividad clínica y serológica (32,40,44) y otros no (42,43,45), esta inconsistencia obedece entre otras al poder estadístico de los estudios, a la falta de control en las variables que influyen en la actividad lúpica (drogas inmunosupresores) como de fármacos empleados comúnmente en LES y que disminuyen la prolactinemia como es el caso de la cloroquina (47). De 6

estudios que tratan de establecer relaciones entre prolactinemia y actividad lúpica (40-45), en sólo tres de ellos fue posible hacer un análisis diferente al original que ayude a explicar en parte esta inconsistencia en base al poder estadístico de los estudios. Jara (40) encontró asociación entre hiperprolactinemia y actividad lúpica, con un poder del estudio del 94 %, en contraste Pauzner y Ostendorf (43,45) no encontraron asociación significativa, con un poder de los estudios de 30.8 % y 10.9 % respectivamente, con alta probabilidad de cometer un error tipo II o β (sin diferencia, cuando si pueden existir). El análisis conjunto de estos datos indica que existe asociación entre hiperprolactinemia y actividad lúpica (véase cuadro 1 y 2).

CUADRO 1. DESCRIPCION DE LOS ARTICULOS DE PROLACTINA Y ACTIVIDAD LUPICA

Característica	Jara (40)	Pauzner (43)	Buskila (42)	Ostendorf (45)	Nehdhar (44)
Número de pacientes	45	82	63	182	29
Mujeres (%)	45 (100)	70 (87.5)	59 (93.7)	168 (92.3)	29 (100)
Edad en años (amplitud)	34.8 (20 - 64) *	43.6 (19.5 - 73.6)	31.6 (16 - 68)	41 (16 - 72)	38 (21 - 60)
Tiempo de evolución del LES en años	5.2 (1 - 15) *	11.8 (0 - 40)	6.8 (1 - 16)	8.5 (1 - 47)	6 (1 - 14)
Frecuencia de HPRL (%)	10 (22.2)	16 (19.5)	10 (15.9)	4 (2.2)	9 (31.0)
Nivel de PRL (todos)	17.2 (3.6 - 188)	NR	NR	NR	19.4 ± 15.6
Nivel de PRL en HPRL	47.2 (20.4 - 188)	31.2 (21 - 68)	35.6 (21 - 57)	29.7 (20.2 - 38.2)	NR
Nivel de PRL en NPRL	NR	10.5 (5 - 20)	10.7 (5 - 19)	7.0 (1.2 - 18.8)	NR
Técnica de medición de PRL	RIA	RIA	IRMA	ELISA	ELISA
Medición de la actividad lúpica	No SLEDAI	SLEDAI	SLEDAI	Schneider	SLEDAI
Diseño del estudio	Transversal descriptivo	Transversal comparativo	Transversal descriptivo	Transversal comparativo	Transversal descriptivo
Prueba estadística	r de Pearson	chi cuadrada	r de Pearson	Kruskal-Wallis	r de Pearson
Significancia estadística	SI	NO	NO	NO	NO
Causas secundarias de HPRL	SI †	SI ‡	NO	NO	NO
Afección renal (%)	4 (8.9)	NR	37 (58.7)	90 (49.5)	0 (0.0)
HPRL y afección renal (%)	2 (20.0)	NR	8 (80.0)	NR	0 (0.0)
NPRL y afección renal (%)	2 (5.7)	NR	29 (54.7)	NR	0 (0.0)
Comparabilidad de grupos	NO **	NO **	SI ††	NO **	NO **
Análisis del poder del estudio	NO	NO	NO	NO	NO

HPRL = hiperprolactinemia. PRL = Prolactina. NPRL = normoprolactinemia. NR = No reportado.

* Sólo pacientes con hiperprolactinemia (> 20 ng/ml)

† Embarazo

‡ Medicamentos

** Información insuficiente a ninguna.

†† Edad, relación mujer:hombre, duración de la enfermedad y frecuencia de uso de esteroides y antipalúdicos.

CUADRO 2. COMPARACION DE ESTUDIOS CLINICOS DE HIPERPROLACTINEMIA Y ACTIVIDAD LUPICA

	Jara (40)	Pauzner (43)	Ostendorf (45)	Jara + Pauzner	Jara + Pauzner + Ostendorf
Número de sujetos	45	52	152	127	309
Frecuencia de hiperprolactinemia (IC 95 %)	22.2 % (10.1 - 34.3 %)	19.5 % (10.9 - 28.1 %)	2.2 % (0.1 - 4.3 %)		
Activos con HPRL	7/10	11/16	1/4	18/28	19/30
Activos con NPRL	5/35	32/68	77/178	37/101	114/279
Diferencia de la frecuencia de HPRL entre activos e inactivos encontrada	49.2 %	12.8 %	1.8 %	21.6 %	8 %
RM (IC 95 %)	14.00 (2.12 - 104.85)	2.34 (0.65 - 9.47)	0.44 (0.01 - 5.59)	3.89 (1.43 - 11.30)	2.8 (1.08 - 8.03)
Valor de p	0.0014 *	0.145 **	0.84 *	0.0058 **	0.030 **
Poder del estudio	94 %	30.8 %	10.9 %	84.8 %	65.9 %
Número de pacientes activos/inactivos para haber podido demostrar si la diferencia encontrada es significativa	7/7	65/65	54/54	25/25	97/97

IC 95 % = intervalo de confianza al 95 %. HPRL = hiperprolactinemia. NPRL = Normoprolactinemia. ND = No determinado.

* Prueba exacta de Fisher.

** Chi cuadrada con corrección de Yates.

Las hormonas sexuales tienen influencia en la respuesta inmune y la PRL sobre las hormonas sexuales. Los andrógenos suprimen el lupus experimental (48) y se ha demostrado que pacientes con hiperprolactinemia tienen generalmente hipogonadismo con niveles bajos de testosterona (37,49,50), esto puede ser explicado porque la PRL inhibe la secreción de gonadotropinas y también disminuye la sensibilidad de las gónadas a las gonadotropinas. El tratamiento con bromocriptina (BCR) tiene un efecto supresor en el LES al normalizar la PRL y como consecuencia a la testosterona (51). Estas evidencias sugieren que la PRL y su interacción con hormonas gonadales pueden tener importantes implicaciones clínicas y terapéuticas en el LES (52).

La BCR al disminuir la PRL parece ser inmunosupresora, ya que ha reducido las manifestaciones clínicas de la uveítis autoinmune en pacientes con hiperprolactinemia y enfermedad de Parkinson (34), mejoró notablemente a una paciente con LES neuropsiquiátrico refractario (53) y en los ratones NZB X NZW que recibieron BCR a largo plazo la aparición de anticuerpos anti-DNA e hipergammaglobulinemia fueron retardadas y la longevidad media se incrementó (4). Se reportó recientemente a cuatro mujeres que desarrollaron LES después de haber tenido niveles séricos elevados de PRL, disminuyendo la actividad de la enfermedad con el uso de BCR y exacerbándose al suspenderla (54). Un estudio clínico no controlado en pacientes con LES y sin

hiperprolactinemia el tratamiento con BCR durante 6 a 9 meses disminuyó la actividad lúpica en los 7 pacientes tratados ($p < 0.05$), así como una disminución de los anti-dsDNA. Posterior a la suspensión de la BCR todos los pacientes mostraron actividad de la enfermedad como de los títulos de anti-dsDNA y de los niveles séricos de PRL (55).

Varios medicamentos que elevan los niveles séricos de PRL (clorpromacina, labetalol, alfa-metildopa y difenilhidantoína) los cuales han sido asociados con la ocurrencia de autoanticuerpos, estos a su vez se han relacionado con el LES "lupus-like" o a la exacerbación de la enfermedad (56-58), enfatizando la asociación propuesta entre hiperprolactinemia y la actividad lúpica.

Hattori en 1992, reportó por primera vez la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con hiperprolactinemia idiopática (59), la presencia de estos autoanticuerpos anti-PRL correlacionó con una acción biológica débil de la PRL en las cinco pacientes estudiadas (menstruaciones regulares y sin galactorrea), el análisis de los autoanticuerpos mostró ser una inmunoglobulina G con baja afinidad y alta capacidad; este estudio no encontró autoanticuerpos anti-PRL en sujetos con niveles séricos normales de PRL. El mismo autor en 1994 (60), reportó en pacientes con hiperprolactinemia idiopática (ninguno con enfermedades autoinmunes) una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL del 16 % (12/75) y una correlación positiva entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL ($r = 0.74$). En contraste, la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en otros estados hiperprolactinémicos fue menor que en hiperprolactinemia inducida por drogas de 4.8 % (3/63), en prolactinomas de 2.7 % (1/37), en hiperprolactinemia por otras causas de 3 % (1/33) y en normoprolactinemia ($< 30 \mu\text{g/L}$) de 1.3 % (3/228). La causa de la presencia de los autoanticuerpos anti-PRL no es clara, se puede especular sobre la secreción de una PRL alterada o que su hipersecreción induzca la formación de autoanticuerpos anti-PRL. Por otro lado, la presencia de autoanticuerpos anti-PRL puede aumentar los niveles séricos de PRL por los siguientes mecanismos: (i) la PRL unida al anticuerpo en virtud de su tamaño escapa a la filtración glomerular y por lo tanto a la degradación renal, un órgano importante para el catabolismo de la PRL (61,62) y (ii) la PRL unida puede alterar los mecanismos de autorregulación en la hipófisis o hipotálamo provocando hipersecreción de PRL. Los niveles elevados de PRL en pacientes con autoanticuerpos anti-PRL puede ser análogo al síndrome autoinmune a la insulina, en la cual grandes cantidades de insulina se unen a los anticuerpos anti-insulina (63,64), sugiriendo que los autoanticuerpos anti-PRL puedan

estar involucrados en la hiperprolactinemia idiopática y por lo tanto en la que se presenta en LES.

JUSTIFICACIÓN

El LES es una enfermedad reumática autoinmune, su prevalencia ha sido reportada en 50.8/100,000 personas mayores de 18 años sin importar sexo o grupo racial y en mujeres de 18 a 65 años es aproximadamente de 1/1,000 (85). Asimismo, es motivo relevante de atención médica y su curso clínico puede variar desde un trastorno leve hasta llegar a ser una enfermedad mortal. Dada la frecuencia y gravedad de la enfermedad aparece la necesidad de investigar y conocer más acerca de los fenómenos inmunológicos involucrados en el LES y sus posibles repercusiones en el espectro de la enfermedad, por lo que nos pareció razonable buscar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES y en caso de haberlos como se relacionan con PRL sérica y con la actividad de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha determinado la presencia de niveles séricos elevados de PRL en pacientes con LES y que correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad (40), por otro lado, se ha encontrado una frecuencia alta de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con hiperprolactinemia idiopática, que su presencia provoca una respuesta biológica débil de la PRL y que correlacionan en forma positiva con los niveles séricos de PRL (60).

El LES es una enfermedad que se caracteriza por una respuesta inmune exagerada con formación de múltiples autoanticuerpos. Por lo que resulta razonable pensar que la hiperreactividad inmunológica en el LES se pudiera encontrar dirigida también hacia la PRL y que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL tenga un efecto protector en la actividad del LES al bloquear la acción biológica de la PRL sobre el sistema inmunológico. Asimismo, es posible que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL pueda ser una de las causas que explicará la hiperprolactinemia en pacientes con LES, dado que los pacientes con LES e hiperprolactinemia no presentan galactorrea y/o

estar involucrados en la hiperprolactinemia idiopática y por lo tanto en la que se presenta en LES.

JUSTIFICACIÓN

El LES es una enfermedad reumática autoinmune, su prevalencia ha sido reportada en 50.8/100,000 personas mayores de 18 años sin importar sexo o grupo racial y en mujeres de 18 a 65 años es aproximadamente de 1/1,000 (85). Asimismo, es motivo relevante de atención médica y su curso clínico puede variar desde un trastorno leve hasta llegar a ser una enfermedad mortal. Dada la frecuencia y gravedad de la enfermedad aparece la necesidad de investigar y conocer más acerca de los fenómenos inmunológicos involucrados en el LES y sus posibles repercusiones en el espectro de la enfermedad, por lo que nos pareció razonable buscar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES y en caso de haberlos como se relacionan con PRL sérica y con la actividad de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha determinado la presencia de niveles séricos elevados de PRL en pacientes con LES y que correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad (40), por otro lado, se ha encontrado una frecuencia alta de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con hiperprolactinemia idiopática, que su presencia provoca una respuesta biológica débil de la PRL y que correlacionan en forma positiva con los niveles séricos de PRL (60).

El LES es una enfermedad que se caracteriza por una respuesta inmune exagerada con formación de múltiples autoanticuerpos. Por lo que resulta razonable pensar que la hiperreactividad inmunológica en el LES se pudiera encontrar dirigida también hacia la PRL y que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL tenga un efecto protector en la actividad del LES al bloquear la acción biológica de la PRL sobre el sistema inmunológico. Asimismo, es posible que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL pueda ser una de las causas que explicará la hiperprolactinemia en pacientes con LES, dado que los pacientes con LES e hiperprolactinemia no presentan galactorrea y/o

estar involucrados en la hiperprolactinemia idiopática y por lo tanto en la que se presenta en LES.

JUSTIFICACIÓN

El LES es una enfermedad reumática autoinmune, su prevalencia ha sido reportada en 50.8/100,000 personas mayores de 18 años sin importar sexo o grupo racial y en mujeres de 18 a 65 años es aproximadamente de 1/1,000 (65). Asimismo, es motivo relevante de atención médica y su curso clínico puede variar desde un trastorno leve hasta llegar a ser una enfermedad mortal. Dada la frecuencia y gravedad de la enfermedad aparece la necesidad de investigar y conocer más acerca de los fenómenos inmunológicos involucrados en el LES y sus posibles repercusiones en el espectro de la enfermedad, por lo que nos pareció razonable buscar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES y en caso de haberlos como se relacionan con PRL sérica y con la actividad de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha determinado la presencia de niveles séricos elevados de PRL en pacientes con LES y que correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad (40), por otro lado, se ha encontrado una frecuencia alta de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con hiperprolactinemia idiopática, que su presencia provoca una respuesta biológica débil de la PRL y que correlacionan en forma positiva con los niveles séricos de PRL (60).

El LES es una enfermedad que se caracteriza por una respuesta inmune exagerada con formación de múltiples autoanticuerpos. Por lo que resulta razonable pensar que la hiperreactividad inmunológica en el LES se pudiera encontrar dirigida también hacia la PRL y que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL tenga un efecto protector en la actividad del LES al bloquear la acción biológica de la PRL sobre el sistema inmunológico. Asimismo, es posible que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL pueda ser una de las causas que explicará la hiperprolactinemia en pacientes con LES, dado que los pacientes con LES e hiperprolactinemia no presentan galactorrea y/o

trastornos menstruales (acciones biológicas de la PRL), y aunado a un estudio que midió prospectivamente dos veces la PRL en 30 pacientes con LES a intervalos de 4 a 6 meses encontrando que a pesar del aumento en la frecuencia de hiperprolactinemia en la segunda medición la actividad lúpica fue menor que en la primera evaluación (43); hace suponer probablemente que un fenómeno inicial en el LES sea el desarrollo de hiperprolactinemia por razones no claras y que esta provoque una respuesta inmune hacia ella con la formación de autoanticuerpos anti-PRL y que estos autoanticuerpos sean los que perpetúen el estado hiperprolactinéxico (bloqueo de la retroalimentación negativa a nivel hipófisis-hipotálamo y/o disminución de la depuración renal de la PRL) y que a pesar de este estado hiperprolactinéxico, la acción inmunoestimuladora sea bloqueada al igual que de sus diferentes acciones biológicas. Un mecanismo alternativo, pero también especulativo es la predisposición genética en algunos pacientes ha mantener la presencia de linfocitos B autorreactivos a la PRL con producción de autoanticuerpos anti-PRL y esto provoque el estado hiperprolactinéxico en LES, esto pudiera ser un factor que pudiera explicar las inconsistencias entre la relación de la hiperprolactinemia y la actividad lúpica, pudiendo interpretar que el subgrupo de pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, este sea más bien un marcador de actividad lúpica como sucede con los otros autoanticuerpos encontrados en el LES y que correlacionan con la actividad de la enfermedad o algunas manifestaciones clínicas.

Al momento actual no hay reportes en la literatura médica en relación a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en el LES, como consecuencia tampoco se sabe que relación guardan con el nivel sérico de PRL y la actividad de la enfermedad. El propósito de este estudio fue hacer una exploración inicial entre los autoanticuerpos anti-PRL y LES.

En base a lo anterior, tratamos de contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES ?
2. ¿Cuál es la correlación de los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con los niveles séricos de PRL en pacientes con LES ?
3. ¿Existe diferencia en la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES activos y no activos ?
4. ¿Cuál es la correlación de los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con la actividad lúpica ?

HIPÓTESIS

1. La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en LES es del 10 %.
2. Existe una correlación positiva entre los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con los niveles séricos de PRL en pacientes con LES.
3. La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL es mayor en pacientes con LES sin actividad de la enfermedad que en pacientes con LES activos.
4. Existe una correlación negativa entre los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con el índice de actividad lúpica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar en pacientes con LES la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL, la relación que existe entre los autoanticuerpos anti-PRL con el nivel sérico de PRL y la actividad lúpica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES.
2. Identificar el tipo de relación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL en pacientes con LES.
3. Determinar si hay diferencia en la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES con y sin actividad lúpica.
4. Identificar el tipo de relación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y el índice de actividad lúpica.

HIPÓTESIS

1. La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en LES es del 10 %.
2. Existe una correlación positiva entre los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con los niveles séricos de PRL en pacientes con LES.
3. La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL es mayor en pacientes con LES sin actividad de la enfermedad que en pacientes con LES activos.
4. Existe una correlación negativa entre los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL con el índice de actividad lúpica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar en pacientes con LES la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL, la relación que existe entre los autoanticuerpos anti-PRL con el nivel sérico de PRL y la actividad lúpica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES.
2. Identificar el tipo de relación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL en pacientes con LES.
3. Determinar si hay diferencia en la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES con y sin actividad lúpica.
4. Identificar el tipo de relación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y el índice de actividad lúpica.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

1. LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO.

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría y el Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

TIPO DE ESTUDIO

I) Para los objetivos específicos 1, 2 y 4.

- a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: Observacional.
- b) Por la captación de la información: Prolectivo.
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal.
- d) Por la presencia de un grupo control: Descriptivo.
- e) Por la dirección del análisis: Sin dirección.
- f) Por la ceguedad en la aplicación y evaluación de las maniobras: Ciego.

DISEÑO:

Estudio Transversal descriptivo.

II) Para el objetivo específico 3.

- a) Observacional.
- b) Prolectivo.
- c) Transversal.
- d) Comparativo.
- e) Sin dirección.
- f) Ciego.

DISEÑO:

Estudio Transversal comparativo.

3. DISEÑO DE LA MUESTRA.

3.1 Población de estudio: Pacientes con LES (incidentes y prevalentes) que fueron atendidos en la unidad participante, cualesquiera que fuera el tiempo de evolución, actividad y tratamiento de la enfermedad.

3.2 Muestra: Se tomaron a todos los pacientes consecutivos de la población de estudio (muestreo no aleatorio) en el periodo comprendido de septiembre de 1996 a abril de 1997 (para los objetivos específicos 1 a 4).

3.3 Grupo de estudio: A partir de la muestra se identificarán a dos grupos, uno con actividad lúpica y otro sin actividad lúpica (para el objetivo específico 3, bajo un diseño pareado).

a) Grupo con actividad lúpica: Pacientes con LES que hayan sido detectados con actividad lúpica.

b) Grupo sin actividad lúpica: Pacientes con LES que hayan sido detectados sin actividad lúpica.

3.4 Criterios de selección:

a) Criterios de Inclusión para la muestra.

1. Pacientes con el diagnóstico de LES con una edad igual o mayor de 16 años.
2. Ser derechohabiente al Instituto Mexicano del Seguro Social y adscrito a la unidad participante del estudio.
3. Aceptar colaborar en el estudio.

b) Criterios de Inclusión para los activos.

1. Iguales que los criterios de inclusión para la muestra en los incisos 1 a 3.
2. Haber sido clasificado con actividad lúpica.

c) Criterios de Inclusión para los no activos.

1. Iguales que los criterios de inclusión para la muestra en los incisos 1 a 3.
2. Haber sido clasificados sin actividad lúpica.

d) Criterios de eliminación.

1. No haberse obtenido en forma completa la información clínica y los resultados de las pruebas de laboratorio.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la unidad de estudio se atendieron en el año de 1996 a 268 pacientes con LES (casos incidentes y prevalentes), por lo que se estimó estudiar en forma factible a aproximadamente 200 pacientes con LES durante el periodo de estudio. Los cálculos para el tamaño de muestra para alcanzar cada uno de los diferentes objetivos fueron como sigue:

A. Para el objetivo específico 1.

No existe en la literatura médica antecedentes de la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES. En pacientes con hiperprolactinemia idiopática sin LES se ha encontrado una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL de 16 %, la frecuencia en el LES de hiperprolactinemia de causa no explicable "idiopática" es de 22 %, de lo anterior la frecuencia esperada de autoanticuerpos anti-PRL es de 3.5 % ($\% \text{ esperado} = (0.16)(0.22) \times 100$). Además tomamos en consideración que una de las características en los pacientes con LES es la detección de múltiples autoanticuerpos, es entonces factible que la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL sea mayor teóricamente que la esperada por considerar solo la prolactinemia. En base a lo anterior, el tamaño de muestra fue calculado con el paquete computacional Epi-Info versión 6. Para un estudio de una encuesta usando muestreo aleatorio, se hipotetizó que los pacientes con LES tienen una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL del 10 % y un valor peor aceptable de 5 %. Con un nivel de confianza del 95 % con un tamaño de población estimada de 200 pacientes, el tamaño de muestra fue de 82 pacientes.

B. Para el objetivo específico 2.

Hattori (80) reportó un $r = 0.74$ entre los títulos séricos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL en hiperprolactinemia idiopática, por lo que esta misma correlación pudo ser operante en los pacientes con LES. Entonces para obtener un coeficiente de correlación de Pearson $r = 0.7$ aceptando un nivel alfa de 0.05 bimarginal y un nivel beta de 0.20, el resultado fue 13 pacientes con autoanticuerpos anti-PRL.

C. Para el objetivo específico 3.

El tamaño de muestra fue calculado con el paquete computacional Epistat. Para una comparación de dos proporciones pareadas aceptando un nivel alfa de 0.05 y un nivel beta de 0.10; con un poder de 90 %. Una relación de activos:no activos de 1:1, el resultado fue de 30 pares (30 con actividad lúpica y 30 sin actividad lúpica). La mínima diferencia a encontrar fue de 30 %, con una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL de 5 % en los pacientes con actividad lúpica. En el anexo 1, se incluye la lista de los factores y los criterios de pareamiento para los grupos de estudio.

D. Para el objetivo específico 4.

Para obtener un coeficiente de correlación de Pearson $r = -0.7$ aceptando un nivel alfa de 0.05 bimarginal y un nivel beta de 0.20, el resultado fue de 13 pacientes con autoanticuerpos anti-PRL.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

I. Para el objetivo específico 1.

1. Pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES).

- Definición operativa. Se consideró que un paciente tiene LES cuando reunió cuatro o más criterios del Colegio Americano de Reumatología (66) (anexo 2).

2. Autoanticuerpos anti-PRL.

- Definición operativa. Se determinó en base al porcentaje de PRL unida a IgG utilizando proteína A acoplada a sefarosa CL-4B como inmunoprecipitante de los complejos (PRL-IgG) y estos últimos detectados con una ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (véase anexo 3).

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Autoanticuerpos anti-PRL negativos.
2. Autoanticuerpos anti-PRL positivos.

II. Para el objetivo específico 2.

1. Títulos de autoanticuerpos anti-PRL.

- Definición operativa: Se determinó en base a los títulos de autoanticuerpos anti-PRL expresados como porcentaje de PRL unida a IgG inmunoprecipitados con proteína A acoplada a sefarosa CL-4B y medidos con IRMA. (anexo 3).
- Nivel de medición: Intervalo.
- Unidad de medición: Porcentaje de radioactividad retenida.

2. PRL sérica.

- Definición operativa: Se determinó en base a la realización por duplicado de la cuantificación sérica de PRL por el método de radioinmunoensayo (RIA) con doble anticuerpos (fase líquida). Diagnostic Products Corporation, Los Angeles (DPC), este estuche comercial tiene una sensibilidad de 1.4 ng/ml.
- Nivel de medición: Intervalo.
- Unidad de medición: ng/ml.

III. Para el objetivo específico 3.

1. Autoanticuerpos anti-PRL

(véase variable 2 para el objetivo específico 1).

2. Actividad lúpica.

- Definición conceptual. Manifestaciones del proceso inflamatorio del LES. Es un reflejo del tipo y gravedad de los órganos implicados en cada punto del tiempo.
- Definición operativa. Puntaje obtenido después de la aplicación del SLEDAI* (Índice de la actividad de la enfermedad en lupus) (67) (véase anexo 4).
- Escala de medición: Nominal.
- Categoría de la variable: 1. Sin actividad lúpica.
2. Con actividad lúpica.

* Para la puntuación del SLEDAI, cada uno de los 24 reactivos que lo conforman es ponderado con un valor que puede ir de 1 hasta 8 puntos. En cada ítem, para obtener la puntuación ponderada debe reunir los criterios propuestos en cualquier momento durante los últimos 10 días. De acuerdo a este puntaje, la menor calificación (0 puntos) corresponde a la situación de ninguna actividad de la enfermedad y el puntaje mayor (105 puntos) corresponde al máximo grado de actividad del LES. De acuerdo a lo anterior, el puntaje mínimo que un paciente puede obtener sería de 0 puntos y el máximo de 105

puntos. Se considerará sin actividad de LES a toda calificación de 0 puntos y con actividad de LES a una calificación igual o mayor de 1 punto.

IV. Para el objetivo específico 4.

1. Títulos de autoanticuerpos anti-PRL.

(véase variable 1 para el objetivo específico 2)

2. Índice de actividad lúpica.

(véase variable 2 para el objetivo específico 3)

- Escala de medición: Intervalo.

- Unidad de medición: Puntaje obtenido por el SLEDAI.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos consistió de las siguientes etapas:

1. **Análisis inicial.** Se procedió a analizar la distribución de las frecuencias de las diferentes variables consideradas en el estudio, utilizando para ello las medidas de resumen apropiadas a cada variable de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución. La consistencia en la medición de la PRL y los autoanticuerpos anti-PRL se realizó mediante el coeficiente de variación.

2. **Análisis bivariado de las variables estudiadas.** Durante esta etapa se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) o Spearman (r_s) según el caso para identificar la correlación de las variables bajo estudio (objetivo específico 2 y 4) y del coeficiente de determinación.

3. **Análisis pareado.** Una vez detectados a los pacientes con actividad lúpica, se identificaron sus características (sexo, edad, duración de la enfermedad, PRL sérica, intensidad del tratamiento y tratamiento con cloroquina) con los que se trato de parear a los pacientes sin actividad lúpica (anexo 2), sin embargo, no fue posible el pareamiento y se procedio a realizar un análisis no pareado con la siguiente secuencia: 1) Análisis bivariado: a) la prueba de chi cuadrada con corrección de continuidad de Yates para variables nominales (autoanticuerpos anti-PRL y sexo), b) la prueba de chi cuadrada de M-H de tendencia lineal para variable con más de dos categorías (intensidad del tratamiento) y c) la prueba t de student no pareada o U de Mann-Whitney (según la

distribución de los datos) para variables continuas (edad, tiempo de evolución de la enfermedad, dosis de cloroquina y PRL sérica); y 2) Modelos de regresión logística para determinar el grado de independencia de los autoanticuerpos anti-PRL de otras variables de estudio con la actividad lúpica.

Durante este último proceso e independientemente de la significancia estadística se determinó el poder del estudio.

El nivel de significancia estadística en todos los casos fue $p < 0.05$ bimarginal para una hipótesis nula.

Hipótesis nulas:

1. No hay correlación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL.
2. No hay diferencia en la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES con y sin actividad lúpica.
3. No hay correlación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y el índice de actividad lúpica.

RESULTADOS

Descripción general. La población de estudio incluyó a 242 mujeres y 17 hombres, una relación mujer : hombre de 15.2 : 1, edad media de 35.6 ± 11.0 años (amplitud 16 – 66) y duración de la enfermedad de 108.8 ± 103.0 meses (amplitud 1 – 447, mediana de 76). Las características clínicas y demográficas de los 259 pacientes con LES se presentan en la tabla 1. La concentración sérica de PRL medida por RIA fue de 12.7 ± 14.0 ng/ml (amplitud 0.4 - 111.9, mediana de 8.5), en 41 pacientes se encontró hiperprolactinemia (HPRL) definida como > 20 ng/ml (15.8 %, IC 95 % 11.4 - 20.2 %), la frecuencia de HPRL en hombres fue de 3/17 (17.6 %, IC 95 % 0 – 35.7 %) y en mujeres de 38/242 (15.7 %, IC 95 % 11.1 – 20.3 %).

Evaluaciones para detectar autoanticuerpos anti-PRL. Los coeficientes de variación intra como interensayo en la determinación de PRL (en suero como en las fracciones de cromatografía) y del porcentaje de unión de la PRL a IgG fueron menores del 8 %.

a) Porcentaje de unión de PRL a IgG. En 24 sujetos sanos, 14 con normoprolactinemia (amplitud 2.5 – 15.7 ng/ml) y en 10 mujeres embarazadas con HPRL (amplitud 27.3 - 290.1 ng/ml) el porcentaje de PRL unida a IgG fue de 0.35 ± 0.4 % (amplitud 0 - 1.1 %). En 13 pacientes con LES el porcentaje de unión de PRL a IgG fue mayor a la media + 3 DE (1.55 %) de los controles sanos (figura 1).

b) Filtración en gel. La cromatografía de filtración en gel de todos los sueros con porcentaje de unión de PRL a IgG mayor de 1.55 % mostró que toda la PRL inmunorreactiva o la mayor parte de ella fue eluida en las fracciones del peso molecular de la IgG (150 kDa) (figuras 2-4), en cambio, en 19 pacientes con LES e HPRL y en 3 mujeres embarazadas con porcentajes de PRL unida a IgG menor de 1.55 % la cromatografía de sus sueros mostró que toda la PRL inmunorreactiva eluyo en el peso molecular de las fracciones de la pequeña PRL (little PRL, 23 kDa) (figuras 5-8). El porcentaje de la PRL inmunorreactiva eluida en las fracciones de peso molecular de 150 kDa en el suero de los pacientes con porcentaje de unión de PRL a IgG mayor de 1.55 % fue significativamente mayor que del suero de pacientes con unión de PRL a IgG menor a 1.55 % (65.8 ± 11.8 % vs 4.4 ± 6.6 %, $p = 0.0001$). La determinación de PRL inmunorreactiva en cada fracción utilizando dos técnicas radiométricas (RIA e IRMA) mostró que en los pacientes con porcentaje de unión de PRL a IgG menor de 1.55 % no hubo diferencias significativas en sus concentraciones, en cambio, en los pacientes con

un porcentaje mayor de 1.55 % las mediciones por RIA fueron consistentemente menores que por IRMA (figura 9), por este hecho para medir la PRL en las fracciones de todas las cromatografías se hicieron con IRMA y el porcentaje de recuperación de la PRL en la cromatografía de filtración en gel fue de 104.4 ± 14.3 %.

c) **Cromatografía por afinidad.** La cromatografía por afinidad con proteína A acoplada a sefarosa CL-4B de todos los sueros con porcentaje de unión de PRL a IgG mayor de 1.55 % mostró que la mayor parte o la totalidad de la PRL fue retenida por la columna y eluida en las fracciones ácidas (ricas en IgG) (figuras 10 – 12), en cambio, en los pacientes con LES con porcentaje de unión de PRL a IgG menor a 1.55 % como de embarazadas sanas la cromatografía por afinidad mostró que la PRL no fue retenida por ella (figuras 13 – 16). El porcentaje de PRL inmunorreactiva retenida en la columna de afinidad en el suero de los pacientes con porcentaje de unión de PRL a IgG mayor de 1.55 % fue significativamente mayor que en los sueros con porcentaje de unión de PRL a IgG menor de 1.55 % (76.1 ± 10.0 % vs 1.9 ± 3.5 %, $p = 0.0001$); resultados semejantes fueron encontrados cuando se hizo la cromatografía por afinidad con proteína G (40.1 ± 20.0 % vs 9.3 ± 5.8 %, $p = 0.0001$)(figura 17 – 23).

d) **Autoradiografía.** Para demostrar que este autoanticuerpo anti-PRL es una IgG específica para PRL y no una IgG con actividad de PRL, en cuatro pacientes con HPRL asociada a LES (tres con porcentaje de unión de PRL a IgG mayor de 1.55 % y uno menor a 1.55 %) se preparo suero libre de PRL por el método de dextran-carbón activado y la IgG sérica fue precipitada con sulfato de amonio (anexo 5). En la figura 24, se muestra la autoradiografía después de haber puesto sobre el papel de nitrocelulosa concentraciones diferentes de IgG (25, 50 y 100 μ g) y luego de incubar las tiras de papel con 125 I-hPRL, la autoradiografía muestra que los sueros con porcentaje de PRL a IgG mayor de 1.55 % la IgG unió a la PRL radiomarcada y no así la IgG del paciente con porcentaje de unión de PRL a IgG menor de 1.55 %.

Frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL. Con base en las evidencias anteriores, se identificó a 13 pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, la frecuencia en todo el grupo de estudio fue de 5.0 % (IC 95 % 2.3 % - 7.7 %). El 100 % de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL tenían HPRL. En los 41 pacientes con HPRL, en 14 (34.1 %) había una condición identificable que pudo haber elevado el nivel sérico de PRL (HPRL secundaria), en 6 por uso de medicamentos (haloperidol, verapamilo, domperidona, clorpromacina y amitriptilina), en 4 por insuficiencia renal (una aguda y tres crónica), en 2

por embarazo, en una por hepatitis C crónica activa y en una por hipotiroidismo primario (TSH mayor de 50 UI/ml). En 27 (65.9 %) no se identificó ninguna causa que explicará la HPRL (HPRL idiopática). La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL por subgrupos se describen en la tabla 2.

Relación entre los autoanticuerpos anti-PRL con la actividad lúpica. Por el índice SLEDAI (≥ 1 punto) se identificó a 110/259 pacientes (42.5 %) con actividad lúpica con un puntaje medio de 6.9 ± 6.4 , mediana de 4. La comparación en las características clínicas y demográficas entre los pacientes activos y no activos se presentan en la tabla 3. El análisis bivariado entre la presencia de autoanticuerpos anti-PRL o del porcentaje de unión de PRL a IgG no mostraron diferencia significativa entre activos y no activos. El calculo del poder estadístico del estudio fue de 4.6 % de la diferencia encontrada de la presencia de autoanticuerpos anti-PRL y la actividad lúpica.

Los pacientes activos tuvieron menor edad, menor tiempo de evolución de la enfermedad, niveles de PRL más altos y mayor frecuencia de HPRL al compararlos con los pacientes no activos ($p \leq 0.036$).

Se realizaron modelos de regresión logística, el primero incluyo todas las variables con significancia estadística ($p < 0.05$) en el análisis bivariado y los títulos de autoanticuerpos anti-PRL expresados como porcentaje de unión de PRL a IgG; las variables intensidad del tratamiento y prednisona se incluyeron por haber tenido el nivel de significancia escogido pero no por estar asociadas teóricamente a la actividad, sino porque son índices indirectos de la adecuada clasificación de la actividad de los pacientes y para determinar si las otras variables mantenían independencia. El modelo completo y el reducido se muestran en la tabla 4, el modelo reducido y el modelo completo tuvieron una razón de verosimilitud semejante ($\chi^2 = 2.13$, $p = 0.35$). La prueba de bondad de ajuste mostró que los datos se ajustaron al modelo ($p = 0.17$). El modelo final utilizado mostró que la PRL es un factor independiente asociado a la actividad lúpica (coeficiente = 0.0252, IC 95 % 0.0033 – 0.0470, $p = 0.024$), el resto de las variables no mantuvieron independencia. La prednisona mantuvo significancia, interpretándose como una variable de adecuada clasificación de la actividad lúpica.

Correlación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y la actividad lúpica. En los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL hubo una correlación negativa pero no significativa entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL expresados como porcentaje de unión de PRL a IgG y el puntaje por SLEDAI $r_s = -0.16$ ($p = 0.59$) figura 25. Para

caracterizar a los pacientes con LES con y sin autoanticuerpos anti-PRL se hizo una comparación entre sus variables clínicas, de laboratorio y demográficas (tabla 5), esta comparación mostró que los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL además de tener diferencia significativa en el porcentaje de unión de PRL a IgG, la PRL medida por RIA fue significativamente más alta (33.2 ± 13.8 ng/ml vs 11.6 ± 13.2 , $p = 0.0001$), todos tenían HPRL (100 vs 11.4 %, $p = 0.00001$), la edad fue menor (29.3 ± 6.8 vs 36.0 ± 11.1 años, $p = 0.031$) y menor tiempo de evolución de la enfermedad (50.9 ± 33 meses vs 111.8 ± 105.5 , $p = 0.024$), el nivel de globulinas fue mas alto (3.9 ± 0.92 g/dL vs 3.4 ± 0.72 , $p = 0.03$) y en el resto de las variables no hubo diferencias significativas.

Correlación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y la prolactinemia. Dado que Hattori reporto que el método de RIA subestima el valor de la prolactinemia cuando hay autoanticuerpos anti-PRL y no así el método de IRMA. Antes de realizar la correlación, verificamos si la presencia de autoanticuerpos anti-PRL interfería en las mediciones de la PRL, para tal efecto en todos los pacientes con LES e HPRL se les midió PRL directa, total y libre por RIA e IRMA (anexo 6). La comparación de los métodos mostró que en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL la medición de PRL directa por RIA fue consistentemente menor que la medición de PRL total por RIA, en cambio en los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL las mediciones de PRL directa por RIA fueron semejantes que las mediciones de PRL total por RIA. La medición de PRL directa por IRMA fue semejante que la medición de PRL total por IRMA, tanto en los pacientes con como aquellos sin autoanticuerpos anti-PRL y las mediciones de PRL total por RIA fueron semejantes a las mediciones de PRL total por IRMA (tabla 6). Además en todos los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL la determinación de PRL libre fue menor que la determinación de PRL total con los dos métodos radiométricos.

Para confirmar que el efecto supresivo en la medición de PRL directa por RIA de doble anticuerpo fue debida a los autoanticuerpos anti-PRL; se preparo un pool de suero libre de PRL de 3 pacientes con autoanticuerpos anti-PRL y la IgG fue concentrada con sulfato de amonio (anexo 6). Esta IgG (0.5 mg/100 μ l) fue añadida a 100 μ l del estándar de PRL (53 ng/ml) y la recuperación de PRL fue medida con RIA e IRMA (figura 26). La IgG de este pool de sueros con autoanticuerpos anti-PRL fueron mezclados a diferentes concentraciones con el estándar de PRL, los autoanticuerpos anti-PRL no afectaron los valores de PRL medidos por IRMA, en donde los valores de PRL medidos por RIA de doble anticuerpo disminuyeron de una manera dosis-dependiente al agregar IgG del pool

de sueros; a la concentración de 0.1 mg/100 µl de IgG hubo una recuperación de PRL del 89 % y a la concentración de 0.5 mg/100µl de IgG la recuperación de PRL fue del 37 %.

La correlación entre las mediciones de PRL directa por RIA e IRMA fueron significativas en pacientes con o sin autoanticuerpos anti-PRL, pero fue menor la correlación en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL positivos que en los negativos ($r = 0.90$, $r^2 = 0.81$, $p = 0.0001$ vs $r = 0.97$, $r^2 = 0.94$, $p = 0.0001$) (figura 27).

En los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL hubo una correlación positiva y significativa entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL, siendo mayor la correlación con la determinación de PRL por IRMA que con RIA ($r_s = 0.98$, $r_s^2 = 0.94$, $p = 0.0001$ vs $r_s = 0.82$, $r_s^2 = 0.67$, $p = 0.001$) (figura 28).

DISCUSION

La presencia de niveles elevados de PRL e incluso de HPRL es un hallazgo común en pacientes con LES, sin embargo su causa no es clara. Encontramos una frecuencia de HPRL asociada a LES del 15.8 %, porcentaje similar a otros estudios (40,42-45) y la frecuencia de HPRL asociada a LES fue semejante entre mujeres y hombres.

La asociación del LES con una amplia variedad de autoanticuerpos es una característica de la enfermedad. Aunque algunos autoanticuerpos son considerados marcadores de otras enfermedades, estos son frecuentemente encontrados en el LES, de este modo, los marcadores de esta enfermedad es la potencialidad de la multiplicidad de autoanticuerpos circulantes. La pregunta de si éstos autoanticuerpos son inducidos por antígenos o dado que están codificados en los genes de las células de las líneas germinales y los linfocitos B derivados de ellas escapan a los procesos de selección clonal esta en debate, pero la respuesta puede ser que ocurran ambas cosas.

El presente estudio demostró la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en algunos pacientes con LES. La detección de los autoanticuerpos anti-PRL fue establecida por los siguientes hechos: (i) el porcentaje de PRL unida a IgG utilizando un gel de afinidad (proteína A acoplada a sefarosa), la cual fue elevada, mayor a la media + 3 DE de pacientes controles tanto sanos con normoprolactinemia como sanos con HPRL fisiológica (embarazo) (0.35 ± 0.40 %, considerada como unión inespecífica), (ii) la cromatografía en gel de los sueros mostró que la mayor parte de la PRL inmunoreactiva eluyó en las fracciones del peso molecular de la IgG (150 kDa) y (iii) la PRL inmunoreactiva del suero fue retenida en cromatografías con geles de afinidad, tanto con proteína A como G (proteínas con afinidad para IgG). La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en la totalidad de los pacientes estudiados con LES fue del 5 %; al caracterizar a los pacientes en subgrupos de acuerdo a la presencia de HPRL, en los pacientes con normoprolactinemia no se detectaron autoanticuerpos anti-PRL (0.0 %), en cambio, en los que tenían HPRL la frecuencia fue muy alta (31.7 %, todos los pacientes eran mujeres); al subdividir a los pacientes con HPRL en dos grupos: 1) HPRL idiopática, en aquellos que no se pudo identificar una causa probada que aumentaran los niveles séricos de PRL la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL fue aún mayor (40.7 %) y 2) HPRL secundaria, aquellos en que se pudo identificar una causa que explicara la HPRL fue menor (14.3 %).

Estas frecuencias por grupos de autoanticuerpos anti-PRL son más altas que las reportadas por Hattori y cols. (80), ellos encontraron en pacientes con HPRL idiopática y sin trastornos autoinmunes una frecuencia del 18 % y en HPRL inducida por drogas del 4.8 %.

No hubo relación entre la actividad lúpica y los autoanticuerpos anti-PRL, aunque la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en los activos fue de 5.5 %, sólo fue 0.8 % mayor que en los no activos (χ^2 , $p = 0.99$), sin embargo, el poder estadístico para haber demostrado si esta diferencia es o no significativa fue muy bajo (poder del 4.3 %) con el riesgo de estar cometiendo un error tipo II o β , así mismo aunque hubo una correlación negativa entre el puntaje de la actividad lúpica evaluado con el índice de SLEDAI y los títulos de autoanticuerpos anti-PRL no hubo significancia estadística. En la comparación de los pacientes con y sin actividad lúpica, los que tenían actividad lúpica eran más jóvenes, menor tiempo de evolución de la enfermedad y tenían niveles séricos más elevados de PRL y mayor frecuencia de HPRL ($p \leq 0.036$), otras variables significativas entre los pacientes con actividad lúpica fue la intensidad del tratamiento, siendo más frecuente el empleo de dosis mayores de 15 mg de prednisona al día (23.6 % vs 3.4 % en los no activos), que concuerda cuando se comparo la dosis de prednisona mg/día ($p \leq 0.003$), la intensidad del tratamiento como la ingesta de mayor dosis de PDN son indicadores indirectos de una adecuada clasificación de pacientes con actividad lúpica y no relacionadas a la actividad, otras variables no mostraron diferencias estadísticas.

La caracterización de los pacientes de acuerdo a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL, mostró que los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL son más jóvenes, tienen menor tiempo de evolución de la enfermedad, los niveles de globulinas y PRL son más elevados y mayor frecuencia de HPRL ($p \leq 0.03$).

Al igual que Hattori y cols. (88), encontramos que los valores de PRL medidos por RIA son más bajos que los medidos por IRMA en la presencia de autoanticuerpos anti-PRL, esta interferencia de los autoanticuerpos anti-PRL con el sistema de RIA de doble anticuerpo puede obedecer a que la PRL es una molécula grande y tiene varios epitopos y por lo tanto accesible a la unión de los anticuerpos anti-PRL endógenos como a los anticuerpos de los reactivos, el autoanticuerpo anti-PRL no desplaza la unión de ^{125}I -hPRL del anticuerpo del reactivo y permite su unión tanto a la ^{125}I -hPRL como a la PRL sérica (libre o unida al autoanticuerpo) y dado que el segundo anticuerpo puede tener una reacción cruzada con la inmunoglobulina humana o por la precipitación por el

polietilenglicol con el que se mezcla el segundo anticuerpo gran parte del trazador es precipitado causando resultados falsamente bajos. Este mismo fenómeno se ha descrito en la determinación de tiroglobulinas por RIA cuando existen autoanticuerpos anti-tiroglobulinas, la tiroglobulina al igual que la PRL tienen varios sitios antigénicos (epitopos) (69). En cambio, con el método de IRMA el anticuerpo unido a la fase sólida une a la PRL y luego el segundo anticuerpo radiomarcado se une a la prolactina y no da resultados erróneos en presencia de autoanticuerpos anti-PRL, la razón por la que no interfiere en la prueba es que la PRL retiene completamente su inmunorreactividad aún cuando se encuentra unida al autoanticuerpo anti-PRL dado que los anticuerpos del reactivo reconocen diferentes epitopos.

Hubo una correlación positiva y significativa entre los niveles séricos de PRL medidos por RIA e IRMA y los títulos de autoanticuerpos anti-PRL, siendo mejor su correlación con IRMA. En los pacientes que se identificó la presencia de autoanticuerpos anti-PRL, estos fueron detectados como una macroprolactina o big-big PRL (> 100 kDa) todos tenían HPRL, lo que sugiere que los autoanticuerpos anti-PRL se relacionan al incremento de la prolactinemia en estos pacientes con LES, esto último además apoyado por la correlación positiva entre los niveles séricos de PRL y los títulos de autoanticuerpos anti-PRL. La unión de la PRL al autoanticuerpo anti-PRL hace que la depuración a nivel renal de la PRL este alterada por su tamaño molecular, Hattori y cols. (70), demostró que la administración intravenosa a ratones del complejo PRL-IgG obtenido de una paciente con hiperprolactinemia idiopática sin trastorno autoinmune, la depuración de la PRL de la circulación en los ratones fue retardada significativamente que cuando se inyectó PRL humana sin autoanticuerpo anti-PRL desde los primeros 10 minutos y hasta los 40 minutos que duró su experimento ($p < 0.05$). También el incremento de la PRL en presencia de autoanticuerpos anti-PRL puede deberse al bloqueo en la retroalimentación negativa de la secreción de PRL a nivel del eje hipotálamo-hipófisis.

El significado de la presencia del autoanticuerpo anti-PRL no es clara, es posible que células B autorreactivas productoras de autoanticuerpos anti-PRL sea el fenómeno inicial y esto provoque el aumento de la PRL sérica en algunos pacientes, o bien a que el evento primario sea la elevación de los niveles séricos de PRL con o sin alteraciones antigénicas y esto sea lo que induzca la formación del autoanticuerpo anti-PRL en pacientes susceptibles a alteraciones inmunes como en el LES. El significado clínico de los autoanticuerpos anti-PRL en la actividad lúpica no la pudimos dilucidar en este

estudio. La participación de la PRL en la actividad lúpica en humanos es inconsistente, unos lo apoyan (32,40,44), y otros no (42,43,45), sin embargo en los estudios que no han encontrado asociación el poder estadístico de los estudios ha sido bajo (menores del 40.0 %) (71) y sin tomar en cuenta otros detalles metodológicos de los estudios. Esta investigación mostró que la PRL se relaciona con la actividad lúpica, aunque este diseño no permite establecer relación temporal entre la PRL y la actividad lúpica, existe evidencia en modelos animales en ratones que padecen una enfermedad similar al LES que al inducirles HPRL se provocan efectos más pronunciados de la enfermedad y muerte más temprana (3,4,21,29,30), otras evidencias que apoyan la temporalidad son los reportes de casos en pacientes con HPRL y que posteriormente desarrollan LES (54) y de ensayos clínicos que emplean bromocriptina para inhibir la secreción de PRL en pacientes con LES mejorando su evolución clínica y serológica (53-55). Todo lo anterior sugiere que la PRL juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad y no es sólo un epifenómeno.

Nosotros especulamos que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL pudieran ser protectores en LES ya que potencialmente bloquearían las acciones biológicas de la PRL, básicamente por observaciones clínicas de que en los pacientes con HPRL asociada a LES no se observan los efectos clínicos de la elevación de la PRL, como son la presencia de trastornos menstruales y/o galactorrea. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre autoanticuerpos anti-PRL y la actividad lúpica y tampoco con los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y el índice de actividad de la enfermedad, esto en parte por el bajo poder estadístico del estudio. Sin embargo, por los resultados obtenidos de que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL se relacionan con la HPRL y que sus títulos correlacionan positivamente con la prolactinemia y que la prolactina se relaciona con la actividad lúpica, hace probable que los autoanticuerpos anti-PRL además de ser por sí mismos un marcador serológico de autorreactividad de los linfocitos B y por lo tanto de actividad lúpica, también favorezcan la actividad lúpica al elevar los niveles de PRL al considerar los hallazgos recientes de Hattori (70), él encontró en pacientes con HPRL idiopática con autoanticuerpos anti-PRL, que el complejo PRL-IgG tuvo una acción biológica completa in-vitro utilizando una línea celular de linfoma murino (Nb2) que requiere de PRL para su proliferación; entonces si el complejo PRL-IgG no interfiere con la unión a su receptor, como sucede en la célula Nb2, es posible la unión de este complejo PRL-IgG (macroprolactina) al receptor de las células del sistema inmune que se

encuentran en la circulación sanguínea provocando su proliferación y activación (12,26,27,28), pero sin efecto sobre otras células blanco que no se encuentran directamente en contacto con la circulación sanguínea (mama, ovario, hipotálamo, entre otras).

CONCLUSIONES

En conclusión, demostramos la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en forma de una macroprolactina de ~150 kDa (big-big PRL), la cual esta formada por un complejo inmune PRL-IgG, solo los encontramos en un subgrupo de pacientes con LES e HPRL en una alta frecuencia y que los niveles de PRL sérica correlacionan positivamente con los títulos de autoanticuerpos anti-PRL. No encontramos relación entre la actividad lúpica y los autoanticuerpos anti-PRL debido en parte al bajo poder estadístico del estudio, pero si hay relación entre la PRL y la actividad lúpica sugiriendo que la PRL pudiera tener un papel patogénico en el LES.

En todos los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL existe HPRL, pero queda por aclarar si su presencia es la causa de la HPRL o es su consecuencia. Finalmente al igual que otros reportes encontramos que la determinación de PRL por RIA en presencia de autoanticuerpos anti-PRL conduce a valores espuriamente bajos, en cambio no hay interferencia en la medición de la PRL por IRMA en presencia de autoanticuerpos anti-PRL.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas en 269 pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Variable	
Edad en años (media + DE)	35.6 ± 11.0
Mujeres (%)	242 (93.4)
Duración del LES en meses (mediana)	76
Tratamiento con cloroquina (%)	67 (25.9)
Intensidad del tratamiento (media ± DE)	2.4 ± 1.1
Intensidad 1 (%)	56 (21.6)
Intensidad 2 (%)	114 (44.9)
Intensidad 3 (%)	31 (12.0)
Intensidad 4 (%)	58 (22.4)
Prednisona mg/día (mediana)	5
Activos (%)	110 (42.5 %)
SLEDAI (mediana)	0
Prolactina ng/ml por RIA (mediana)	8.5
Hiperprolactinemia (%)	41 (15.8 %)
Condiciones asociadas que incrementan la PRL	
En todos (%)	38 (14.7)
Sin hiperprolactinemia (%)	24 (11.0) *
Con hiperprolactinemia (%)	14 (34.1) **

* 7 antidepresivos tricíclicos, 6 hormonales (estrógenos y/o progestágenos), 5 insuficiencia renal crónica, 3 verapamilo, 2 insuficiencia renal aguda y 1 cirrosis biliar primaria.

** 3 insuficiencia renal crónica, 2 embarazo, 2 haloperidol, 1 insuficiencia renal aguda, 1 hipotiroidismo, 1 antidepresivos tricíclicos, 1 clorpromacina, 1 domperidona, 1 verapamilo y 1 con hepatitis crónica C activa.

Tabla 2. Frecuencia de autoanticuerpos anti-prolactina en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Grupo	N	Frecuencia (%)	IC al 95 %
Todos	13/259	5.0	2.3 – 7.7
Sin hiperprolactinemia	0/218	0.0	—
Con hiperprolactinemia	13/41	31.7	17.5 – 45.9
Hiperprolactinemia idiopática	11/27	40.7	22.2 – 59.2
Hiperprolactinemia secundaria	2*/14	14.3	0.0 – 32.6

* Drogas (una por anastroptilina y una por clorpromacina)

Tabla 3. Variables clínicas y demográficas de los pacientes sin y con actividad lúpica.

	No Activos (n = 149)	Activos (n = 110)	Valor de p
Edad en años (media \pm DE)	37.3 \pm 11.0	33.4 \pm 10.7	0.005 *
Mujeres (%)	139 (93.3)	103 (93.6)	0.89 **
Duración del LES en meses (mediana)	103	63.5	0.0001 ***
FUM al tiempo de la evaluación en días (mediana)	26.5	20.0	0.14 ***
Intensidad del tratamiento	2.2 \pm 1.1	2.6 \pm 1.0	0.0004 ***
1 (%)	44 (29.5)	12 (10.9)	
2 (%)	67 (45.0)	47 (42.7)	0.003 ‡
3 (%)	5 (3.4)	26 (23.6)	
4 (%)	33 (22.1)	25 (22.7)	
Tratamiento con cloroquina (%)	36 (24.2)	31 (28.2)	0.56 **
Prednisona mg/día (mediana)	5.0	10.0	0.00001 ***
Depuración de creatinina (media \pm DE)	89.3 \pm 30.3	85.5 \pm 32.5	0.33 *
Prolactina ng/ml (mediana)	6.8	11.1	0.00001 ***
Hiperprolactinemia (%)	17 (11.4)	24 (21.8)	0.036 **
Condiciones asociadas que incrementan la PRL	23 (15.4)	15 (13.6 %)	0.82 **
Porcentaje de unión de PRL a IgG (media \pm DE)	0.62 \pm 1.6	0.58 \pm 1.6	0.83 *
Autoanticuerpos anti-PRL (%)	7 (4.7)	6 (5.5)	0.99 **

* t student para muestras independientes.

** chi cuadrada de Mantel-Haenszel con corrección de continuidad de Yates.

*** U-Mann-Whitney.

‡ chi cuadrada de tendencia lineal de Mantel-Haenszel.

FUM = fecha de última menstruación. PRL = prolactina.

Tabla 4. Variables asociadas a actividad lúpica (modelos de regresión logística).

Variable	Modelo completo			Modelo final		
	Coefficiente de regresión	IC 95 %	p	Coefficiente de regresión	IC 95 %	p
Constante	-0.5416	-1.8318 - 0.7487	0.411	-0.6780	-1.7748 - 0.4188	0.226
Prolactina (ng/ml)	0.0337	0.0064 - 0.0610	0.016	0.0252	0.0033 - 0.0470	0.024
Edad (años)	-0.0101	-0.0395 - 0.0194	0.504	-0.0087	-0.0380 - 0.0205	0.558
Duración del LES (meses)	-0.0028	-0.0065 - 0.0009	0.139	-0.0025	-0.0061 - 0.0011	0.172
Prednisona (mg/día)	0.0593	0.0288 - 0.0898	0.0001	0.0592	0.0321 - 0.0862	0.0001
Intensidad del tratamiento	-0.0340	-0.3312 - 0.2632	0.823			
Unión de prolactina a IgG (%)	-0.1345	-0.3220 - 0.0529	0.160			

Tabla 5. Variables clínicas, de laboratorio y demográficas en los pacientes con lupus eritematoso sistémico con y sin autoanticuerpos anti-PRL.

	Sin autoanticuerpos anti-PRL (n = 246)	Con autoanticuerpos anti-PRL (n = 13)	Valor de p
Edad en años (mediana)	36	29	0.031 *
Mujeres (%)	229 (93.1)	13 (100)	1.0 **
Duración del LES en meses (mediana)	82	48	0.024 *
FUM al tiempo de la evaluación en días (mediana)	23	21	0.49 *
Intensidad el tratamiento (mediana)	2	2	0.79 *
Prednisona mg/día (media ± DE)	13.1 ± 23.5	7.5 ± 5.5	0.39 ***
Depuración de creatinina (media ± DE)	87.9 ± 31.6	84.2 ± 24.2	0.67 ***
Prolactina ng/ml (media ± DE)	11.6 ± 13.2	33.2 ± 13.8	0.0001 ***
Hiperprolactinemia (%)	28 (11.4)	13 (100)	0.00001 **
Condiciones asociadas que incrementan la PRL (%)	36 (14.6)	2 (15.4)	1.0 **
Porcentaje de unión de PRL a IgG (mediana)	0.20	8.3	0.00001 *
SLEDAI (mediana)	0	0	0.62 *
C3 mg/dL (media ± DE)	92.0 ± 31.1	99.8 ± 20.3	0.37 ***
C4 mg/dL (media ± DE)	18.8 ± 8.0	19.2 ± 5.3	0.85 ***
Anti-dsDNA UI/ml (media ± DE)	21.9 ± 30.9	27.8 ± 35.8	0.51 ***
Hemoglobina g/dL (media ± DE)	13.5 ± 2.0	12.5 ± 2.0	0.10 ***
Plaquetas x 10 ⁴ / ml (media ± DE)	23.6 ± 7.9	26.3 ± 10.3	0.24 ***
Leucocitos	5,992 ± 2,559	5,784 ± 2,423	0.78 ***
Linfocitos	1,509 ± 702	1,729 ± 688	0.27 ***
Albumina sérica g/dL (media ± DE)	3.8 ± 0.69	3.8 ± 0.45	0.86 ***
Globulinas séricas g/dL (media ± DE)	3.4 ± 0.72	3.9 ± 0.92	0.03 ***

* U de Mann-Whitney.

** Prueba exacta de Fisher.

*** t de student para muestras independientes.

Tabla 6. Comparación en las mediciones de prolactina directa y sus fracciones con dos métodos radiométricos (RIA e IRMA) en pacientes con lupus eritematoso sistémico e hiperprolactinemia de acuerdo a la presencia o no de autoanticuerpos anti-PRL.

	Sin autoanticuerpos anti-PRL (n = 28)	Con autoanticuerpos anti-PRL (n = 9)	Valor de p
Directa por RIA / total por RIA ¶	106.4 ± 12.5	64.3 ± 28.1	0.0003 *
Directa por IRMA / total por IRMA ¶	120.6 ± 17.7	116.2 ± 23.3	0.55 **
Libre por RIA / total por RIA ¶	93.5 ± 11.6	11.7 ± 12.0	0.0001 **
Libre por IRMA / total por IRMA ¶	102.2 ± 15.8	24.6 ± 12.5	0.0001 **
Total por RIA / total por IRMA ¶	94.3 ± 9.6	90.0 ± 14.7	0.31 **

¶ media ± DE del porcentaje de la relación entre las dos mediciones.

* U de Mann-Whitney.

** t de student para muestras independientes.

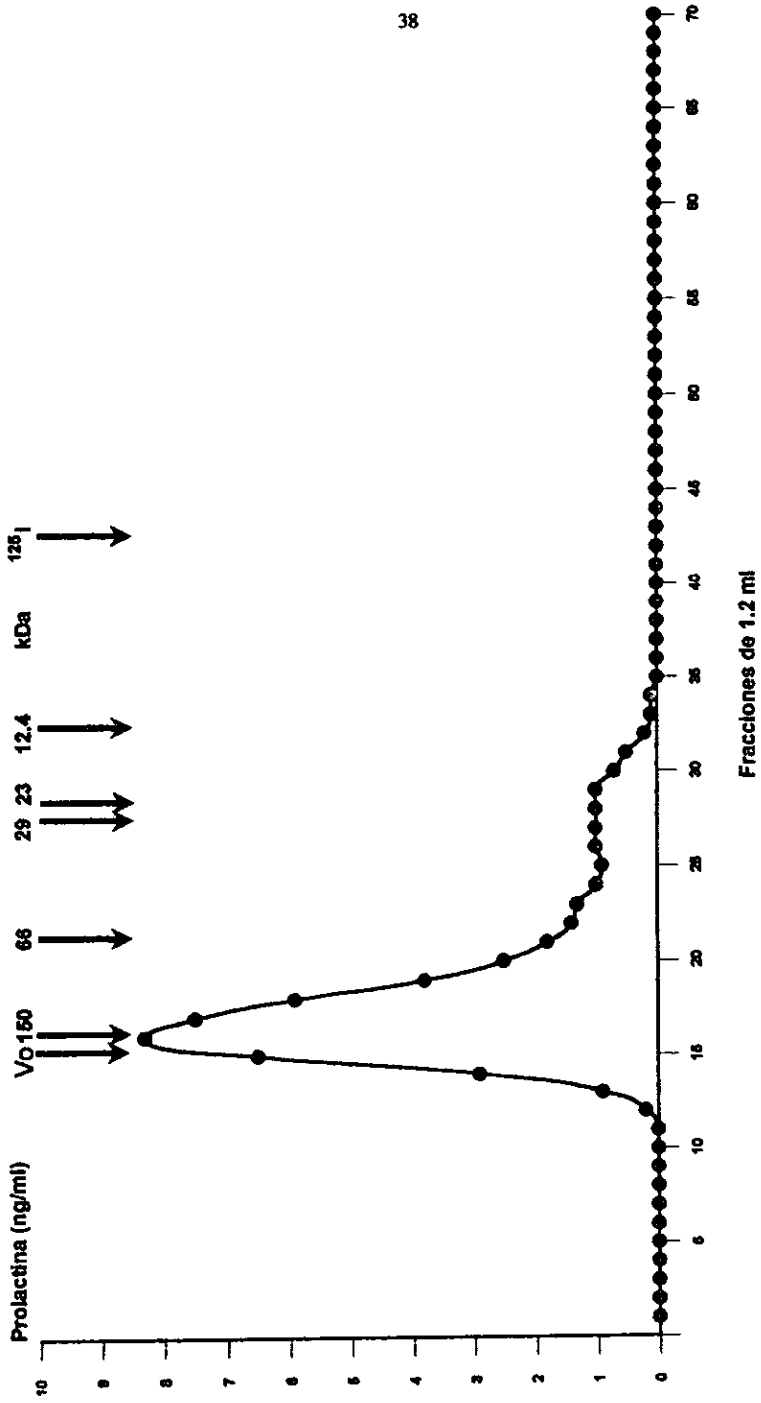


Figura 3. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunorreactiva en suero de una paciente con LES con autoanticuerpos anti-PRL.

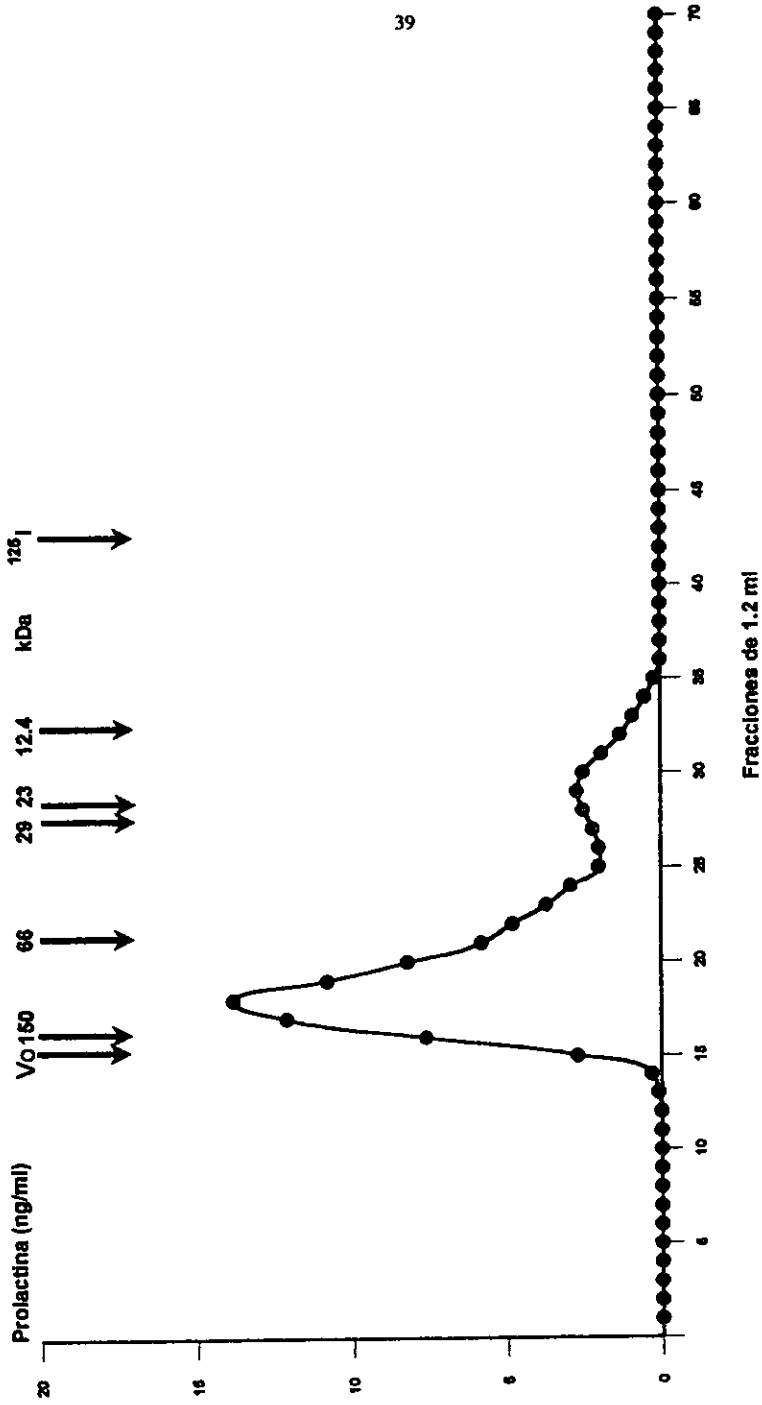


Figura 4. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES con autoanticuerpos anti-PRL.

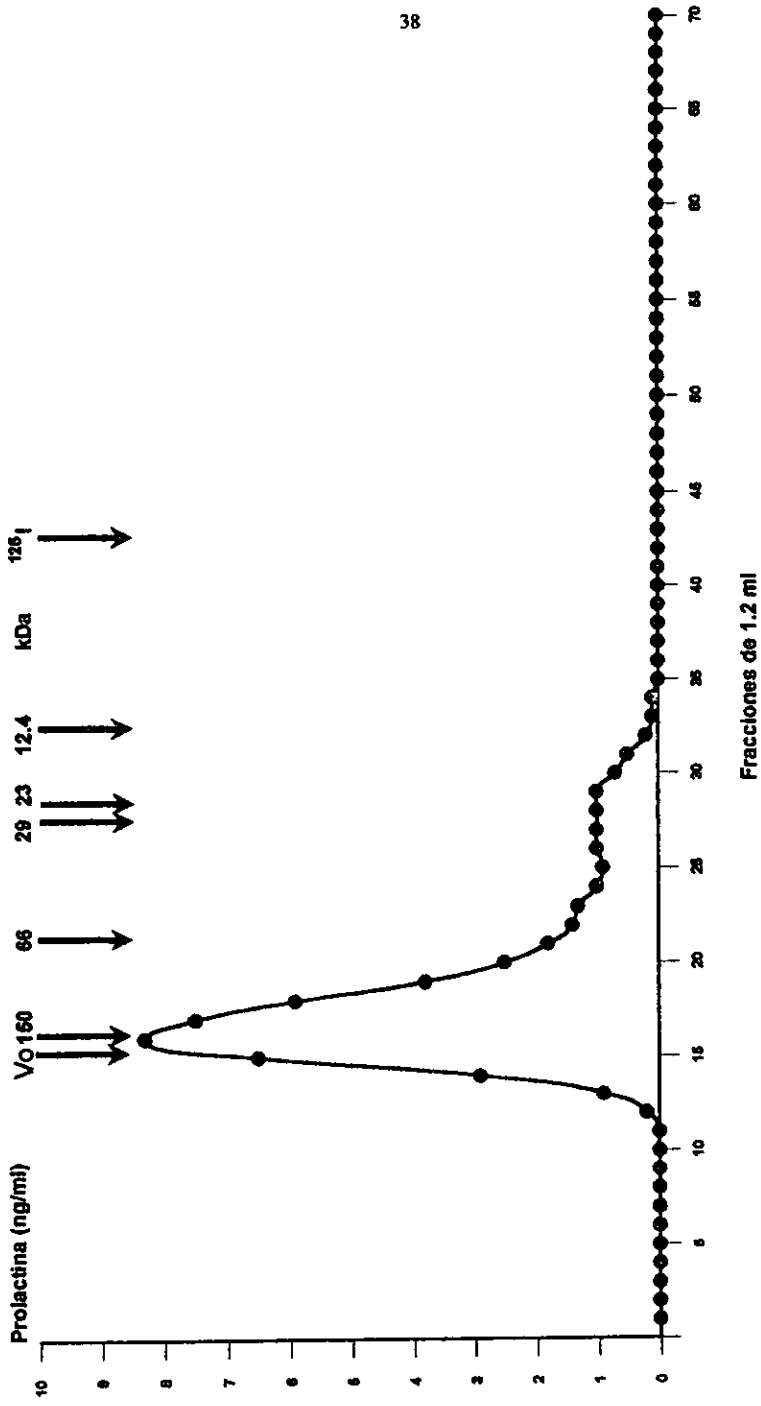


Figura 3. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES con autoanticuerpos anti-PRL.

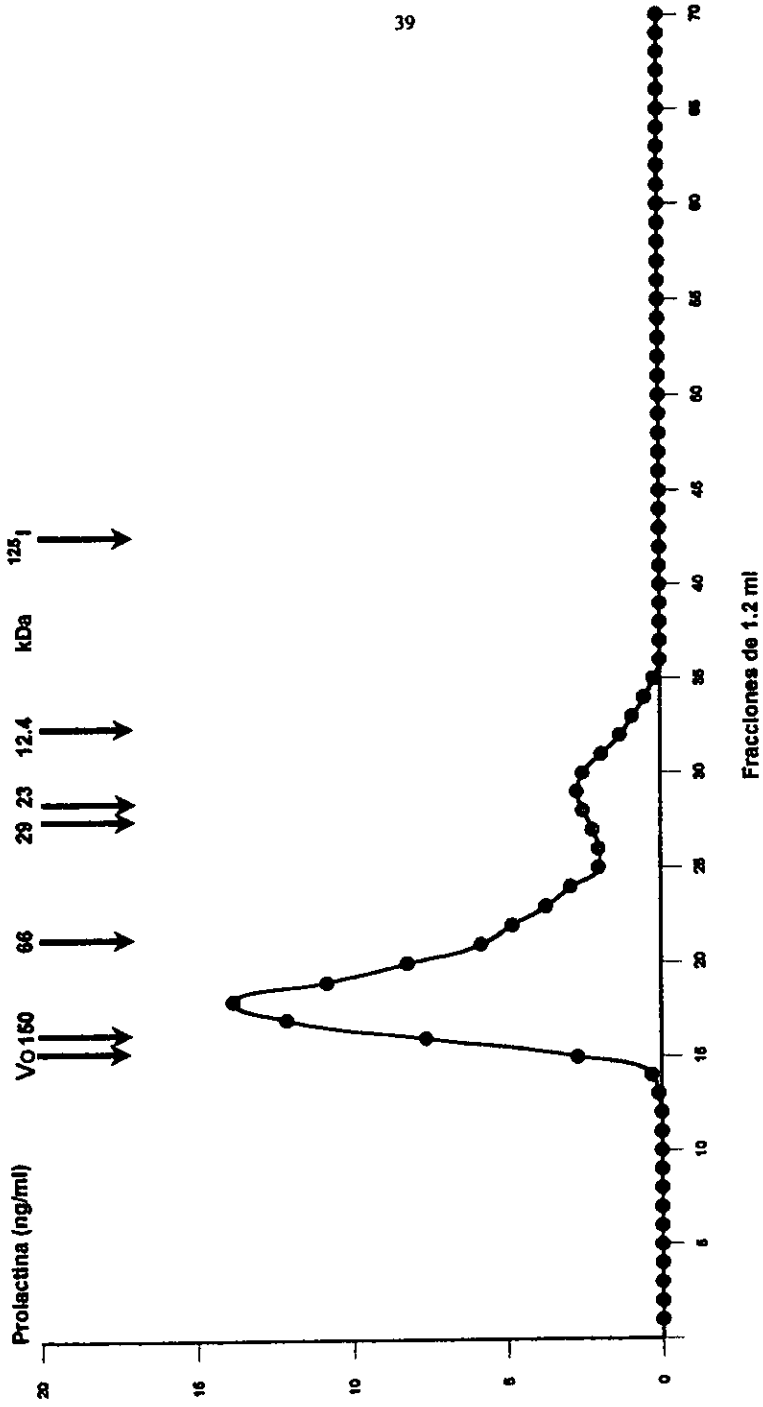


Figura 4. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES con autoanticuerpos anti-PRL.

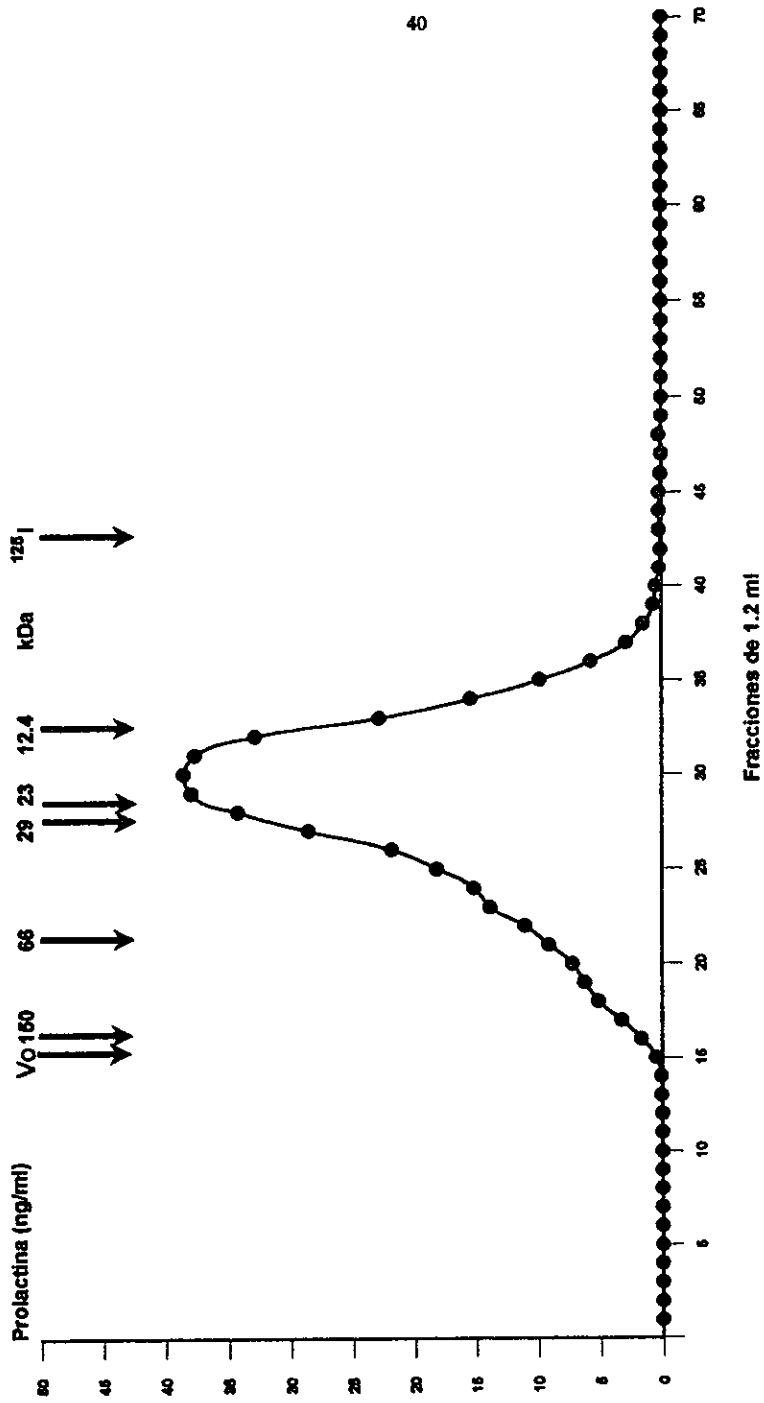


Figura 5. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoespecífica en suero de una paciente embarazada sana sin autoanticuerpos anti-PRL.

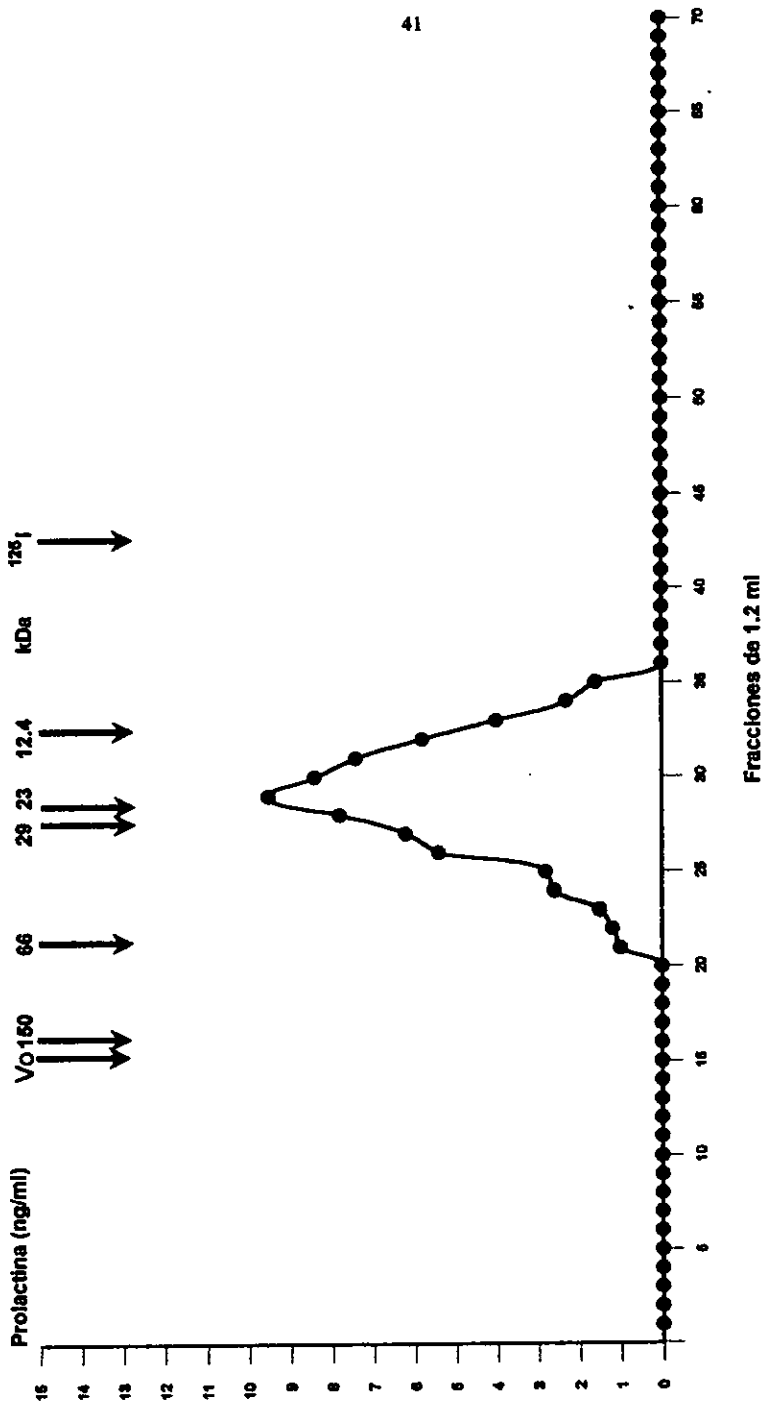


Figura 6. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES sin autoanticuerpos anti-PRL.

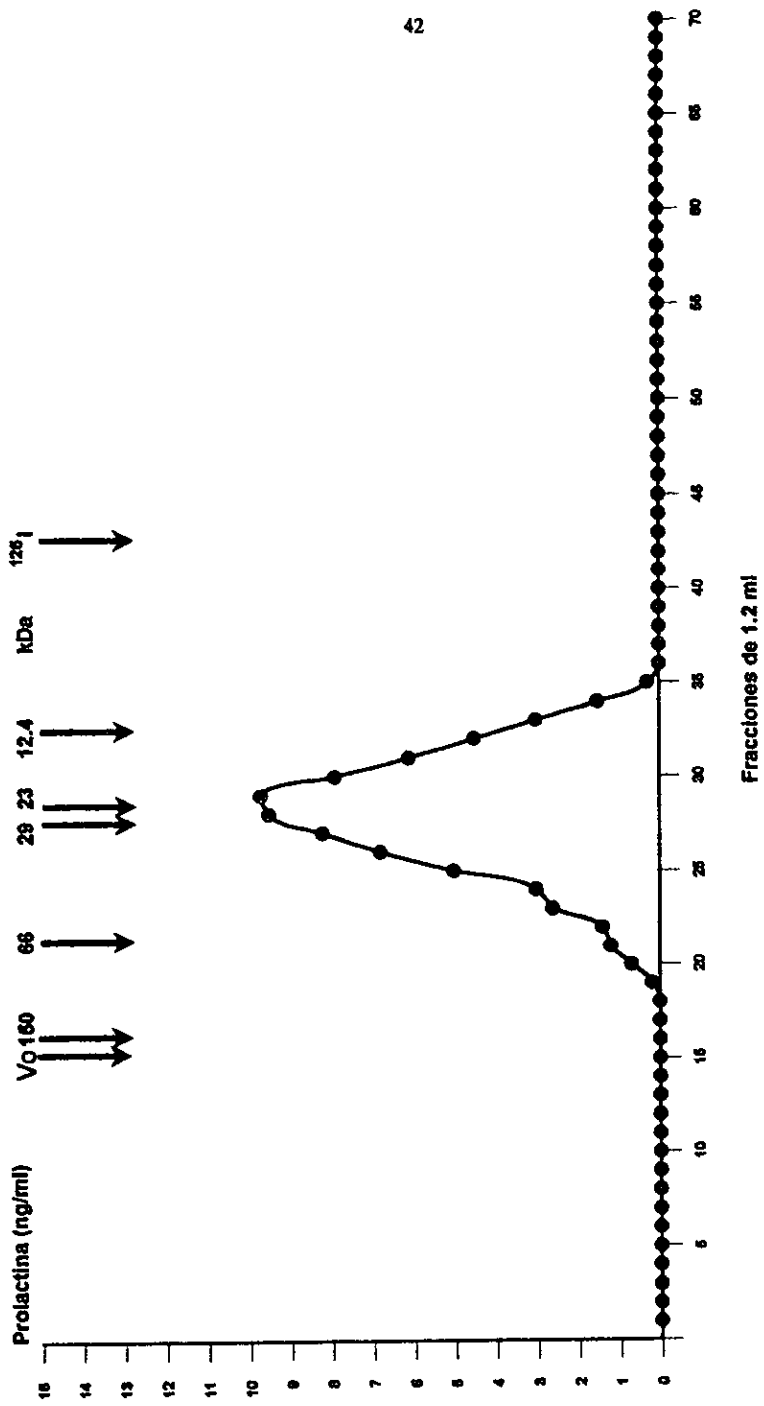


Figura 7. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES sin autoanticuerpos anti-PRL.

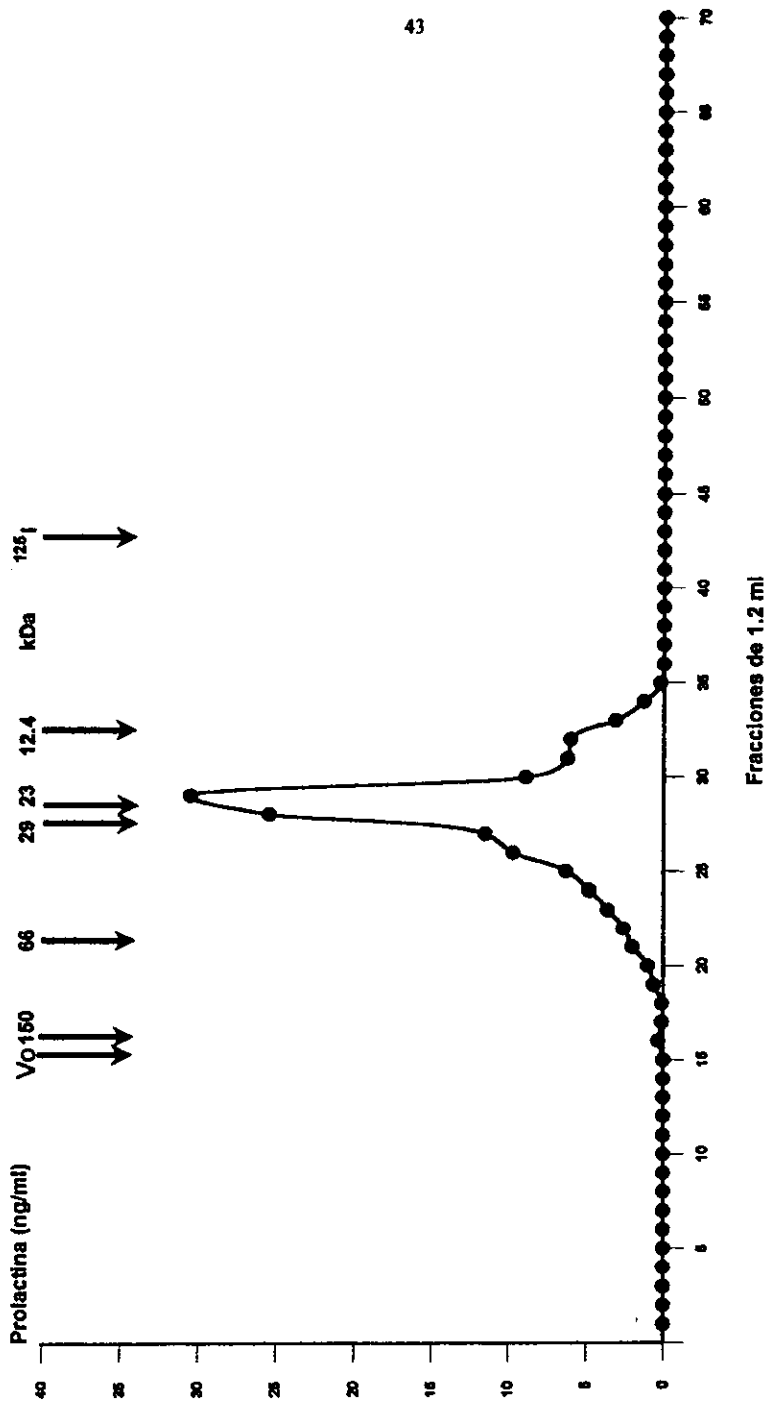


Figura 8. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES sin autoanticuerpos anti-PRL.

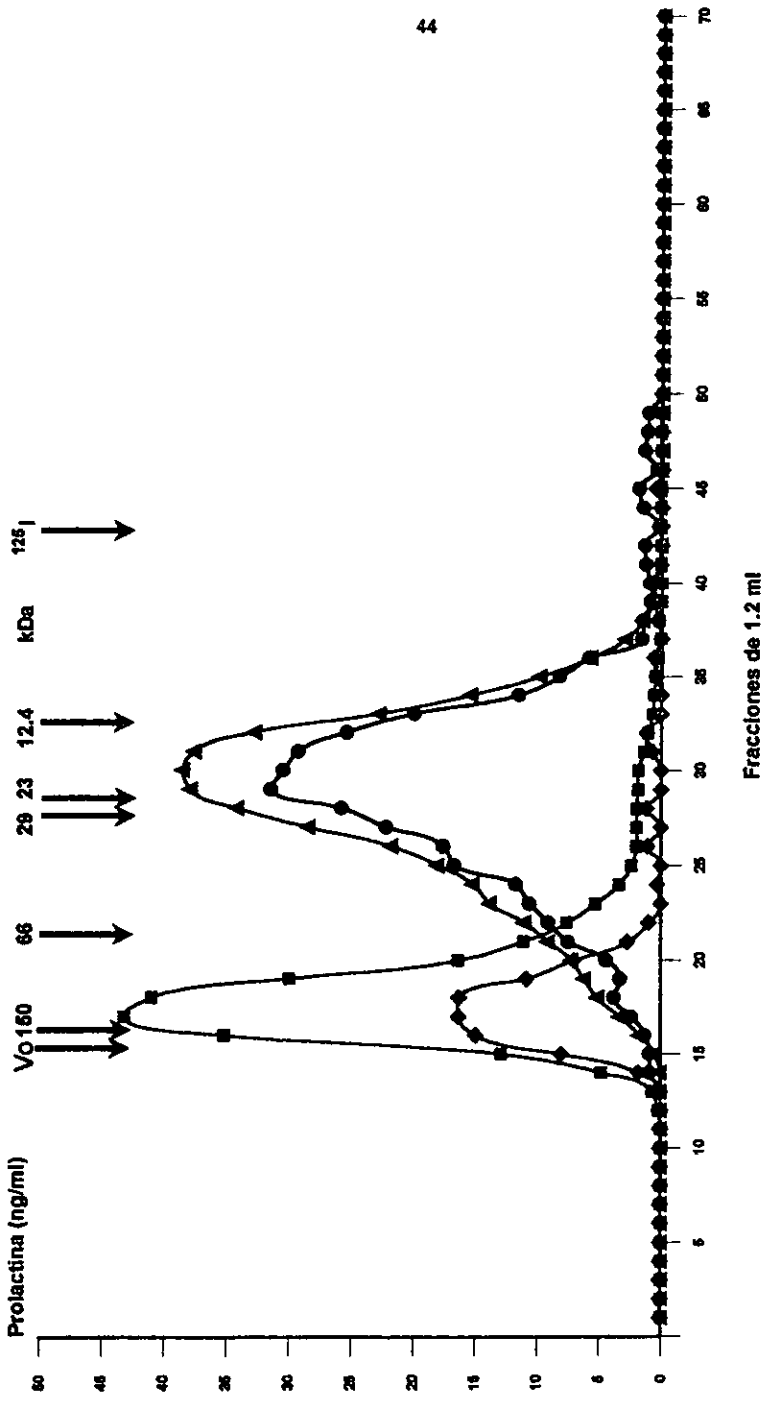


Figura 9. Perfil cromatográfico de la prolactina inmunoreactiva en suero por dos métodos inmunoradiométricos en una paciente con LES con autoanticuerpos anti-PRL (línea con cuadrados por IRMA y línea con triángulos por RIA) y en una embarazada sana sin autoanticuerpos anti-PRL (línea con triángulos por IRMA y línea con círculos por RIA).

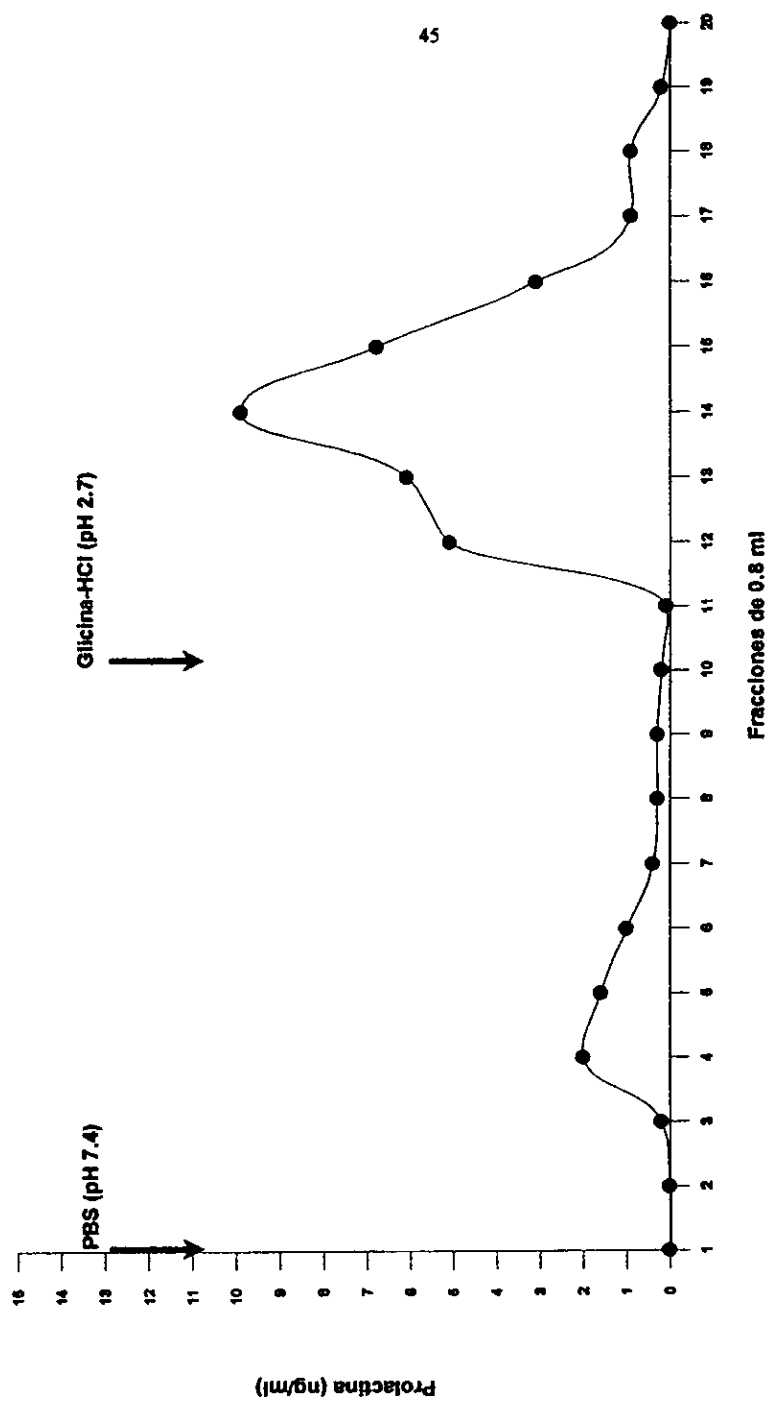


Figura 10. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

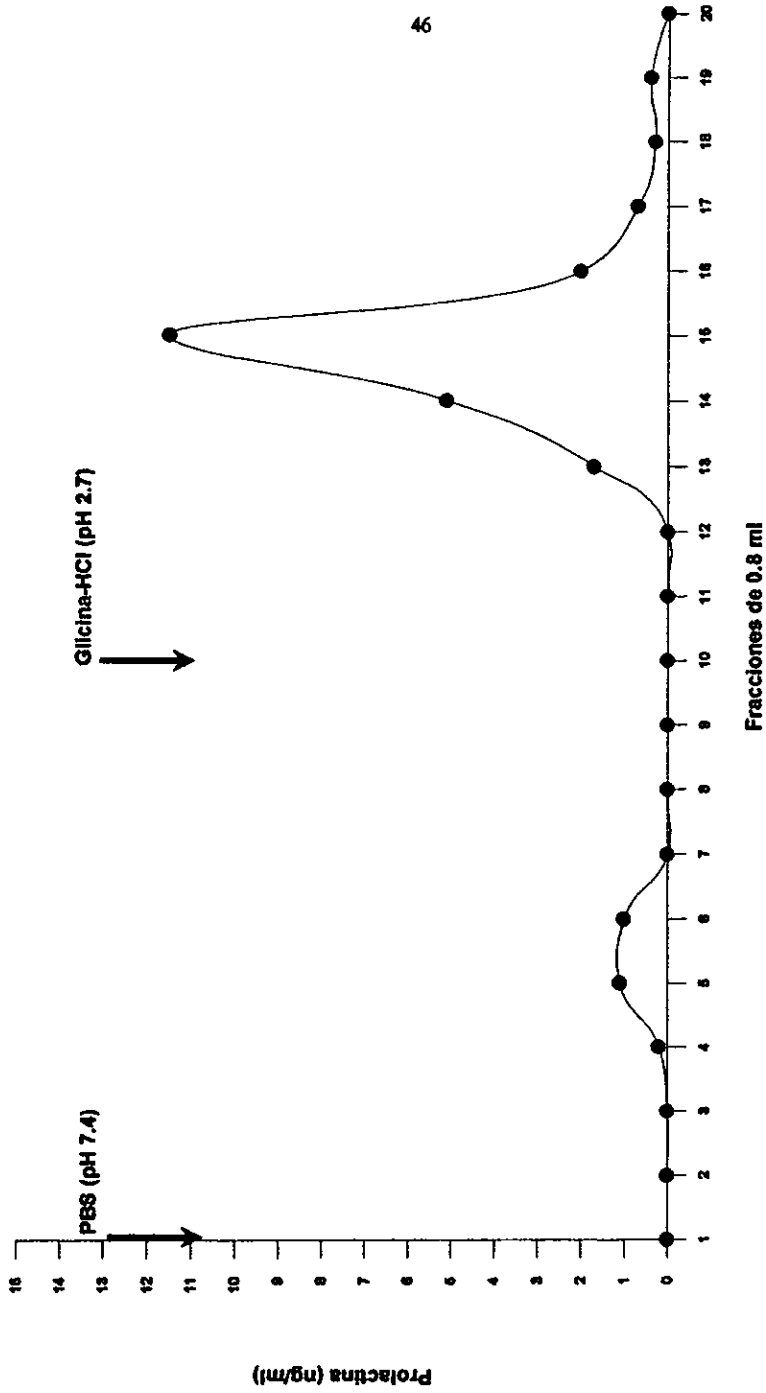


Figura 11. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunorreactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

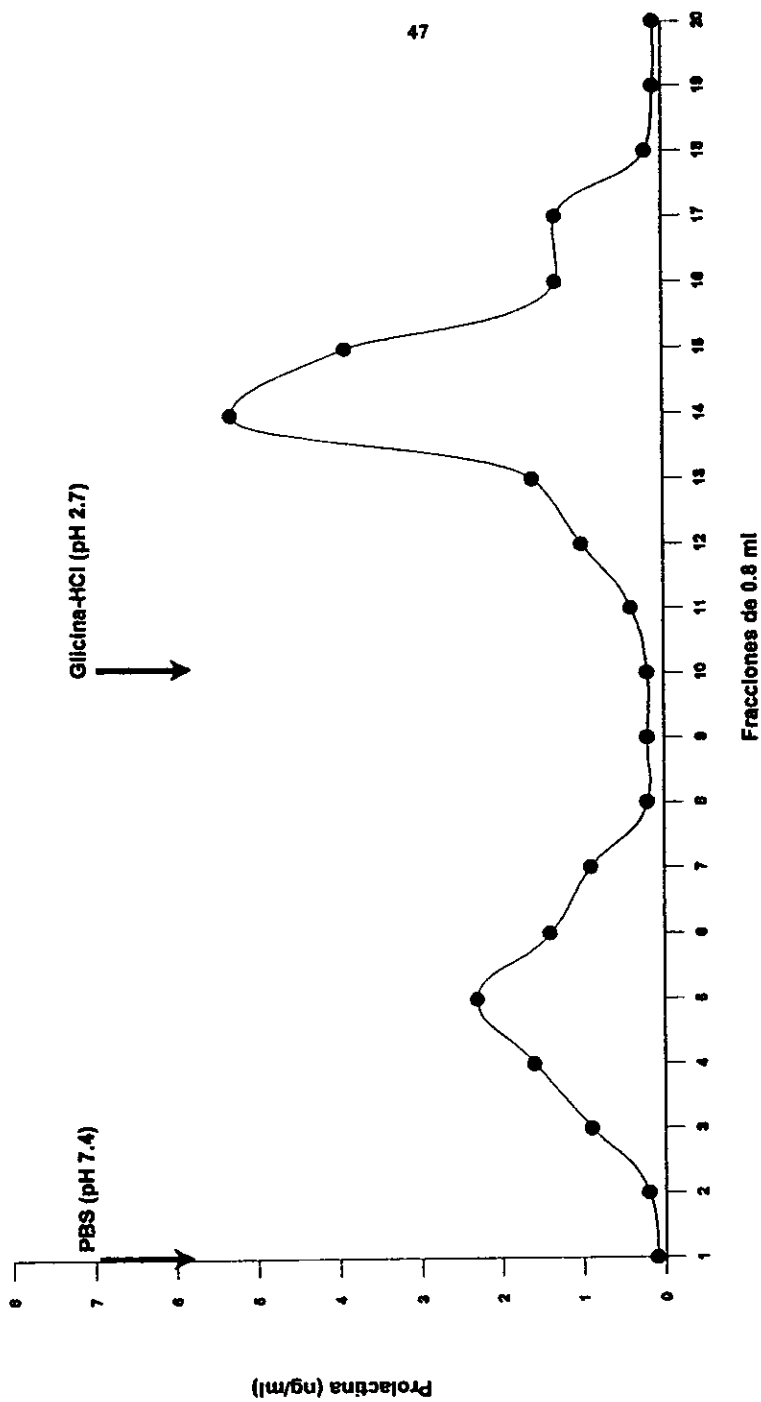


Figura 12. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

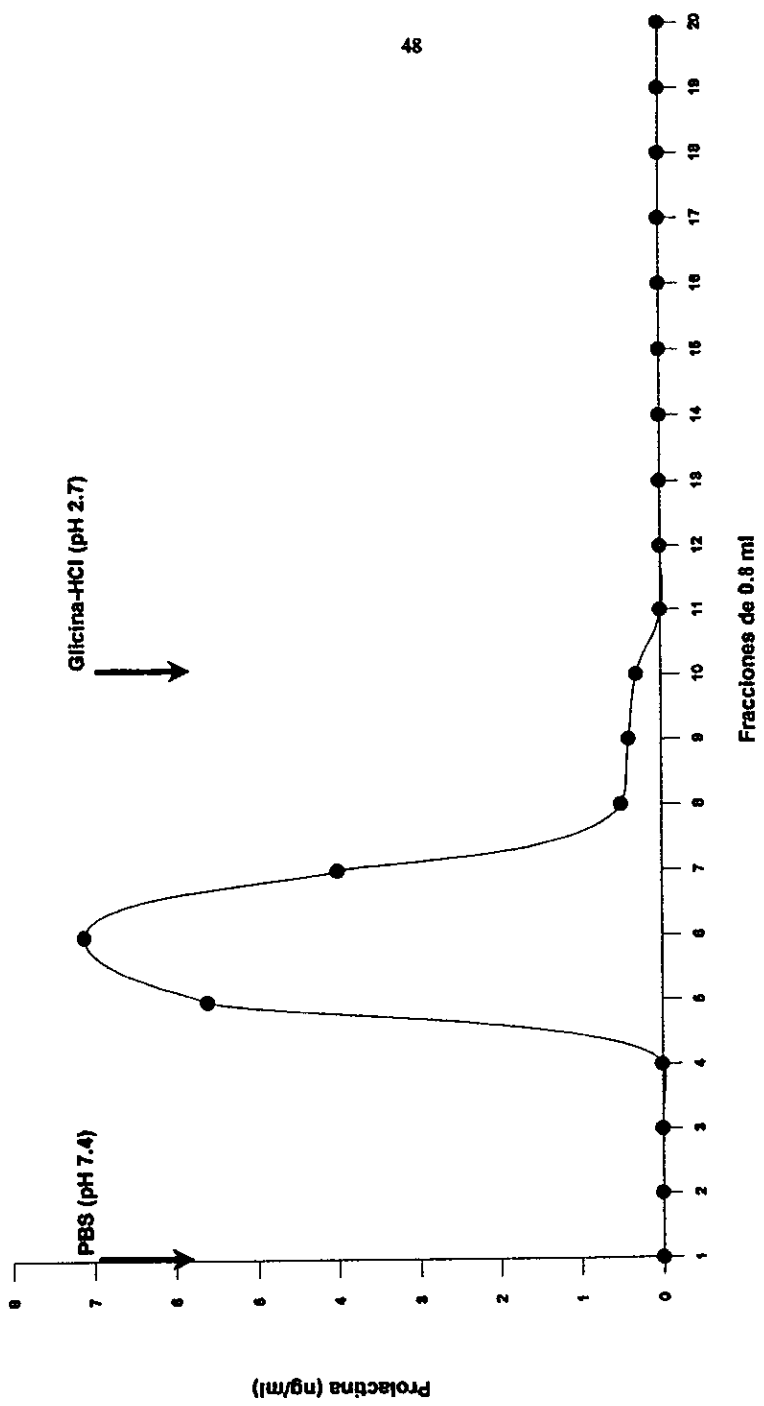


Figura 13. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunorreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL.

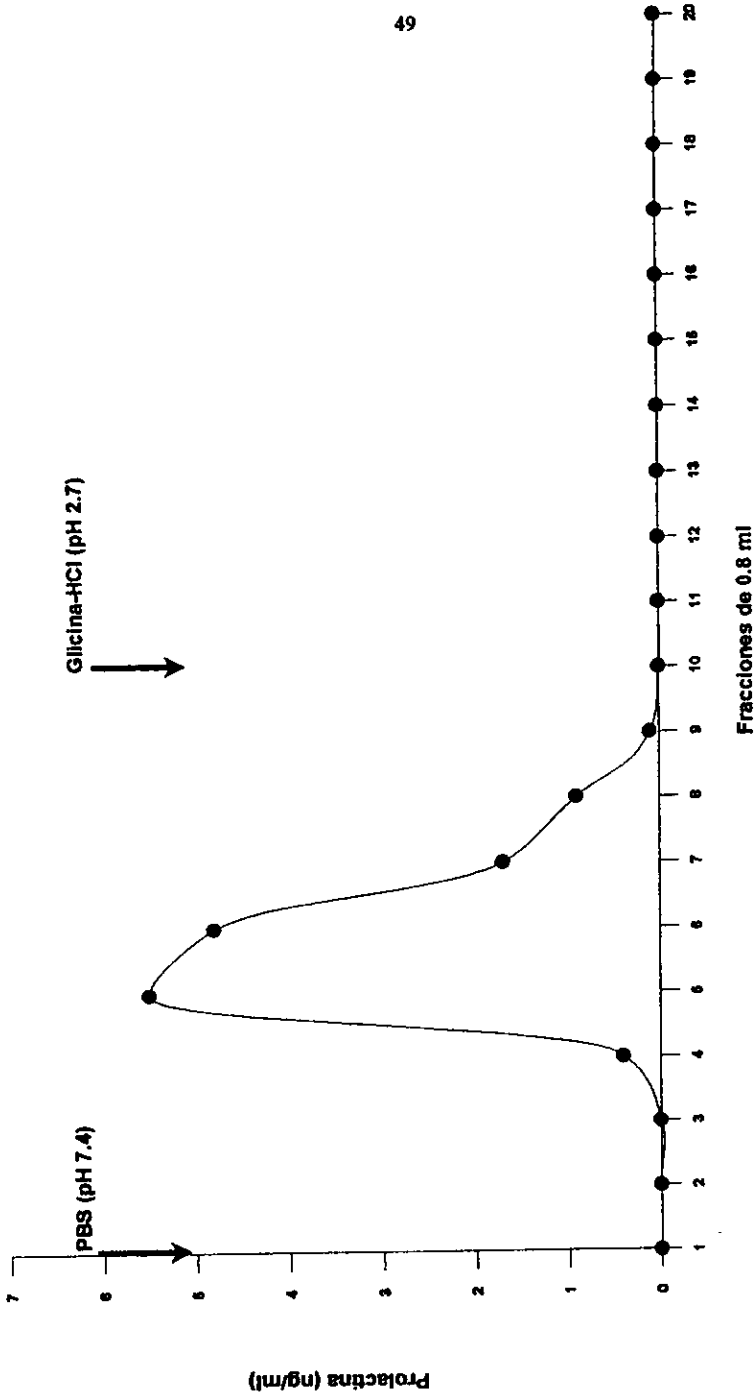


Figura 14. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL.

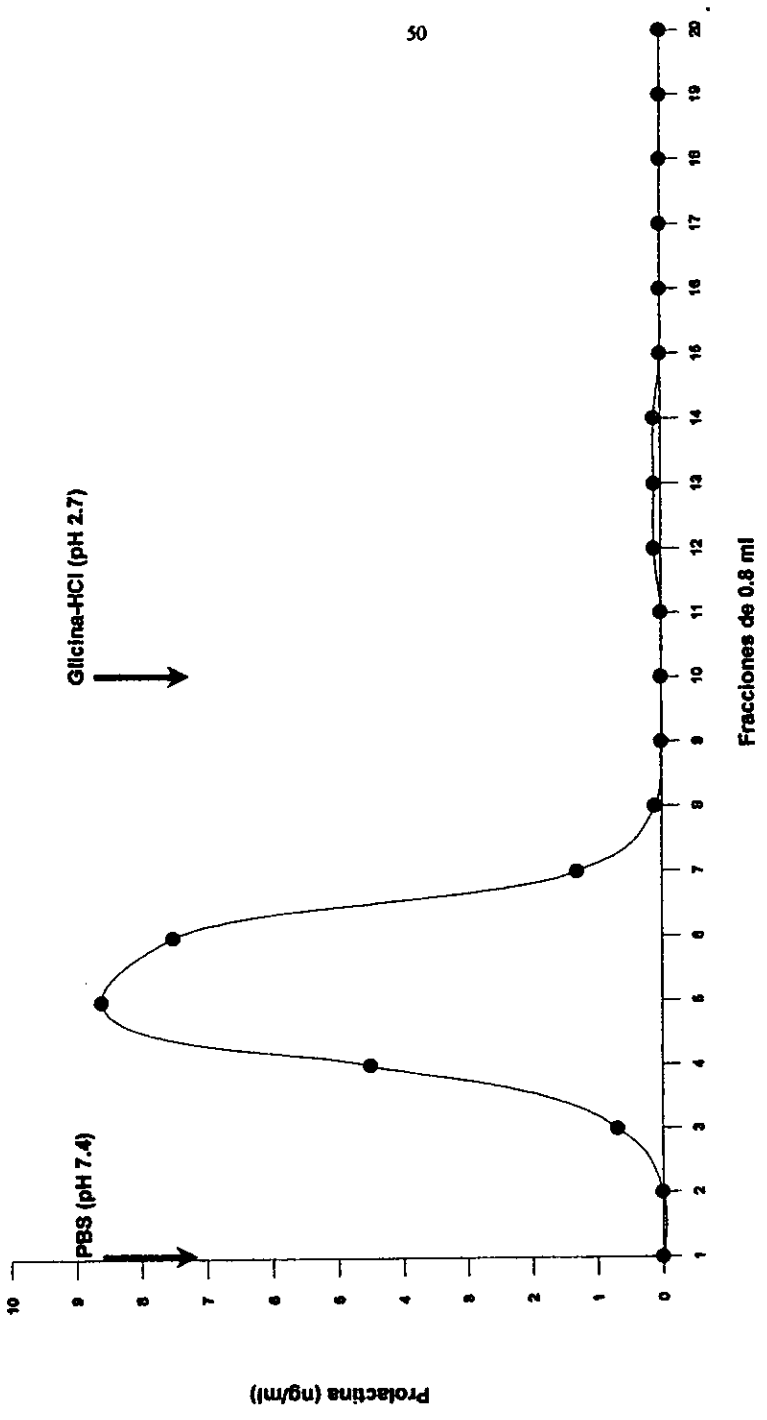


Figura 15. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL

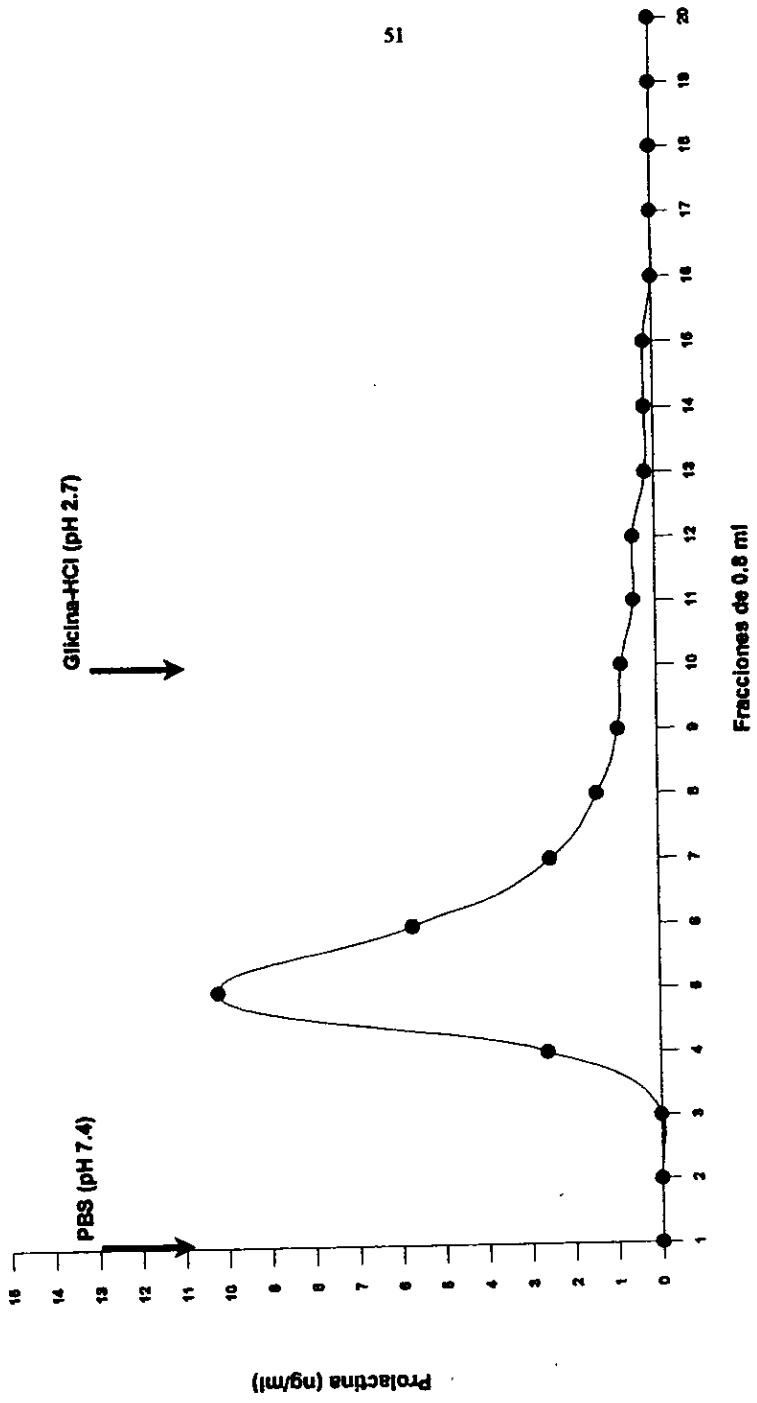


Figura 16. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína A de la prolactina inmunorreactiva en suero de una paciente embarazada sana y sin autoanticuerpos anti-PRL.

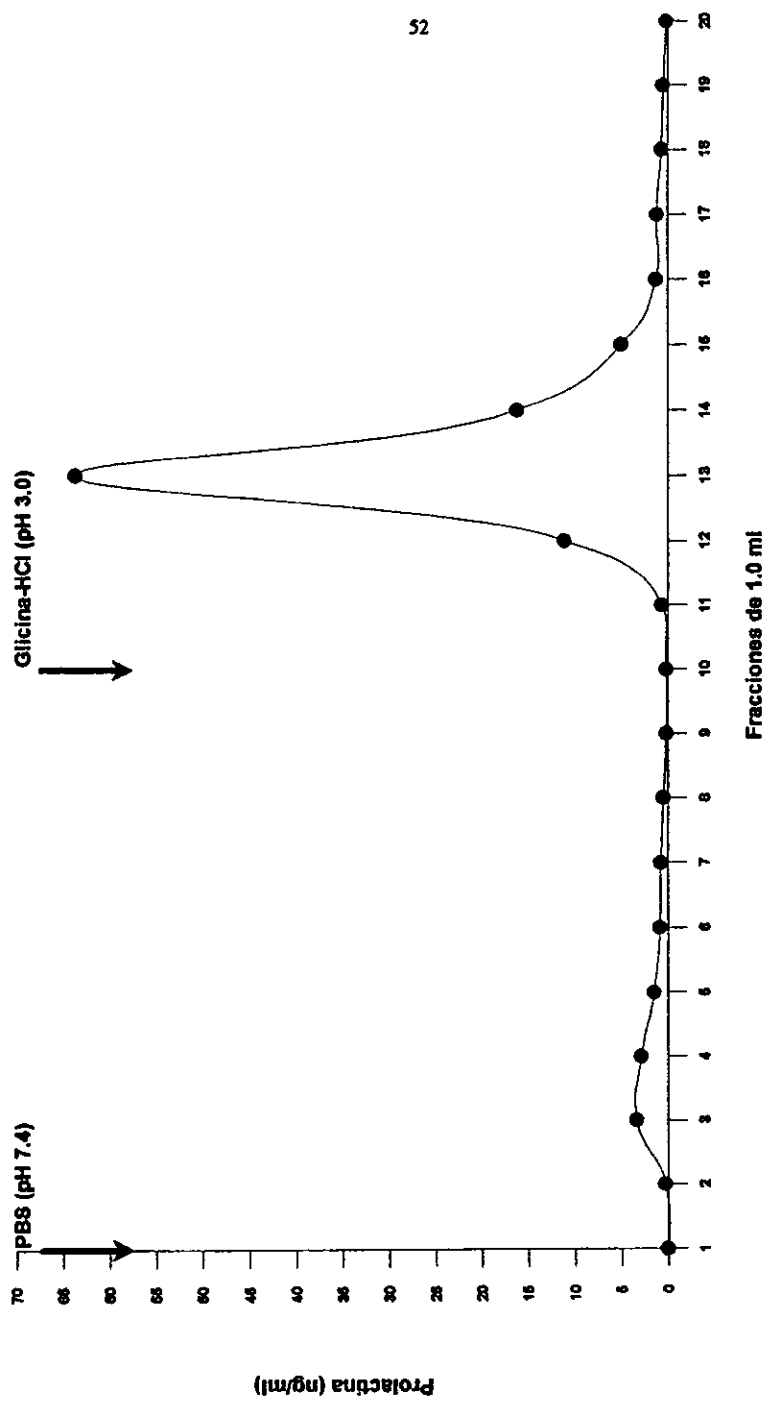


Figura 17. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

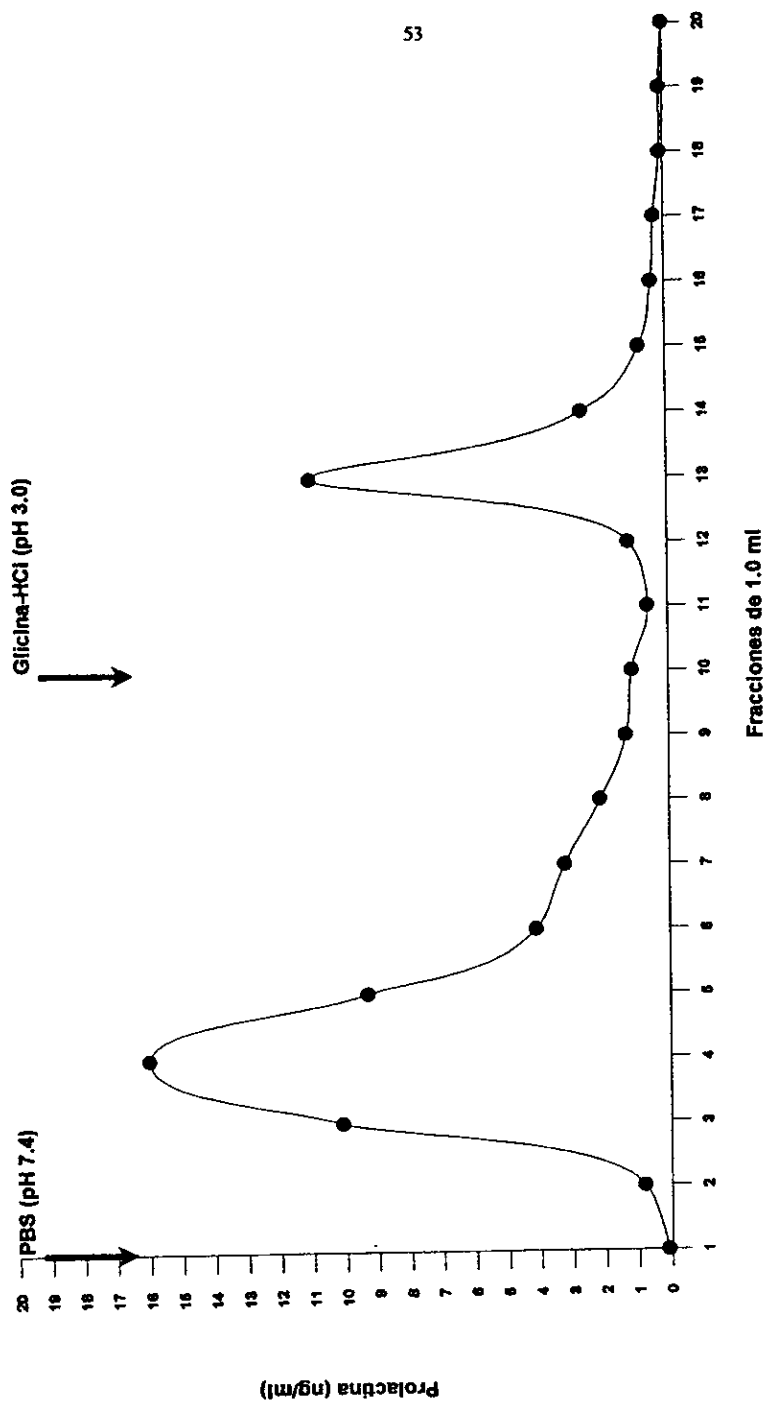


Figura 18. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

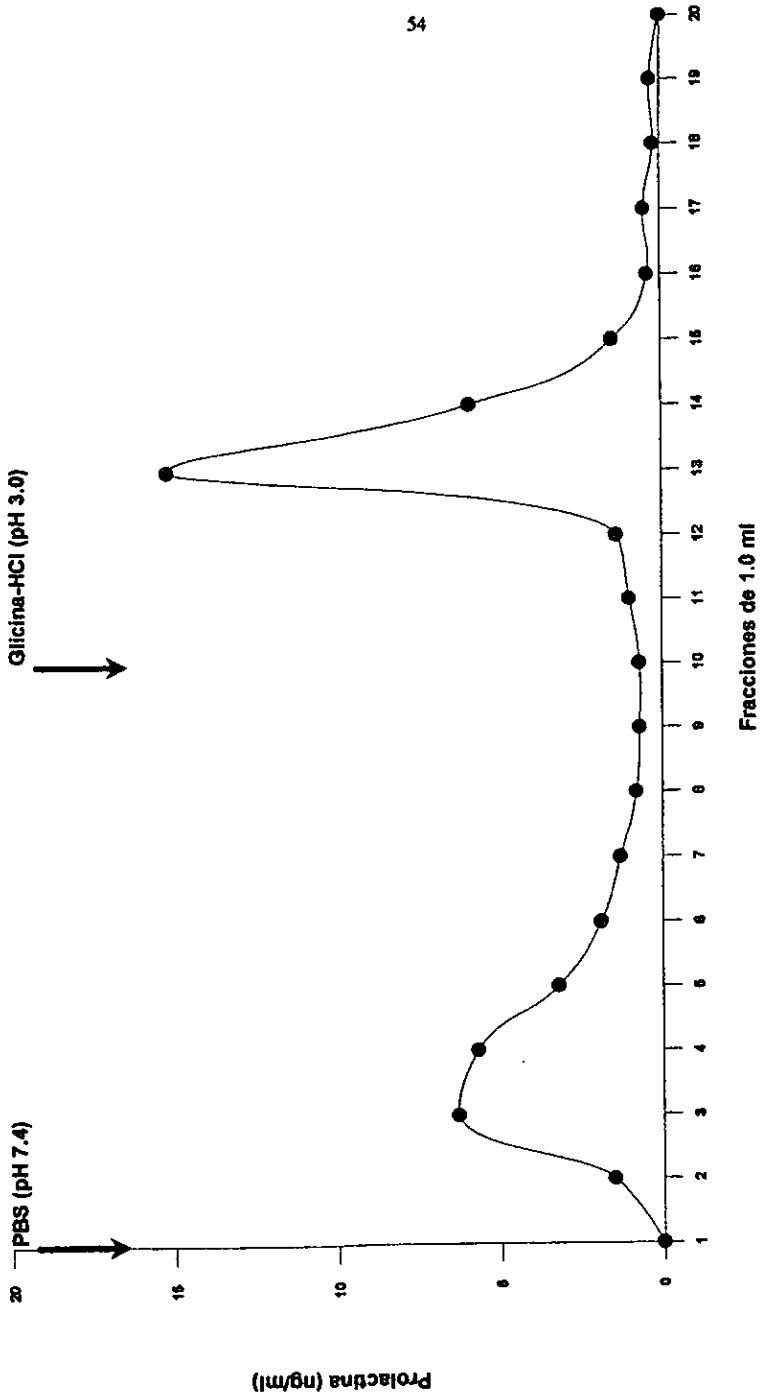


Figura 19. Perfi cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inm, unomeactiva en suero de una paciente con LES y autoanticuerpos anti-PRL.

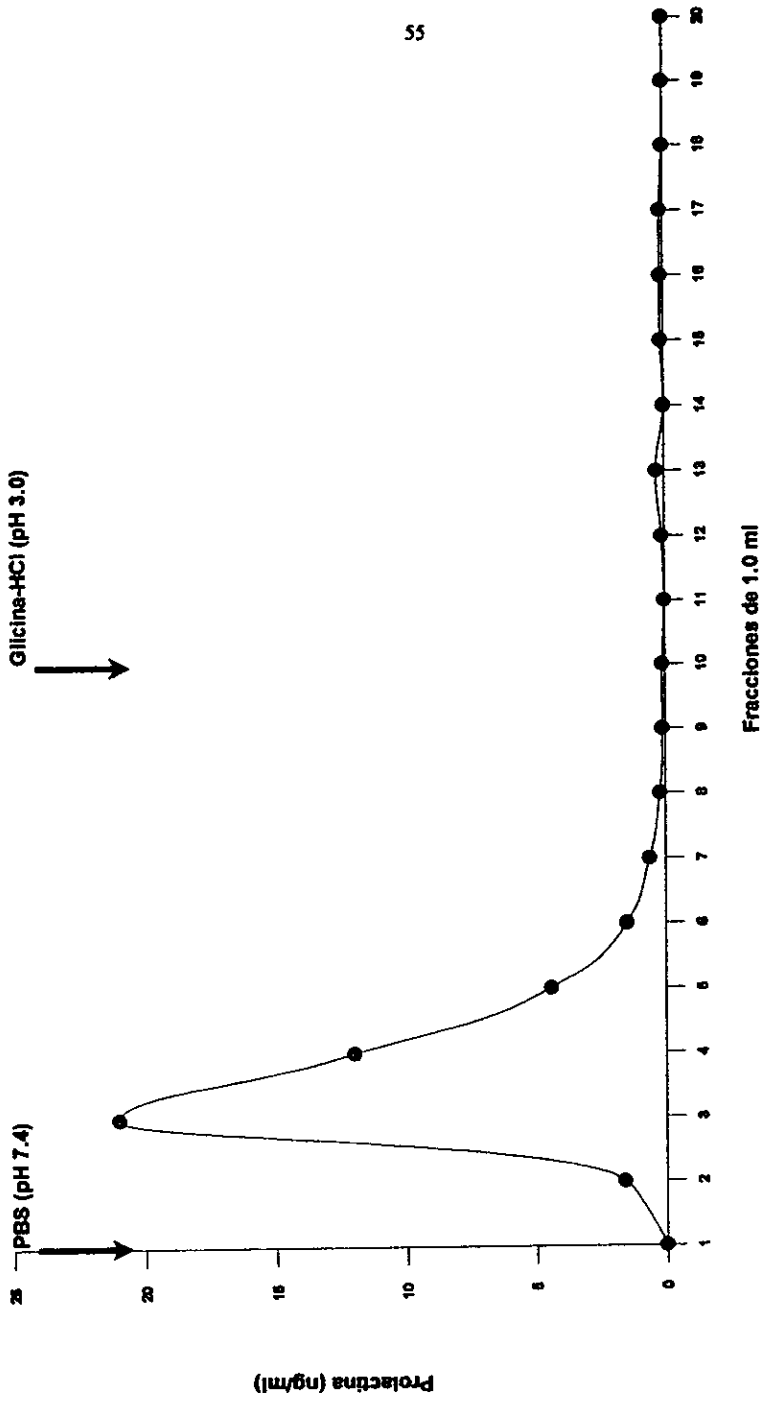


Figura 20. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL.

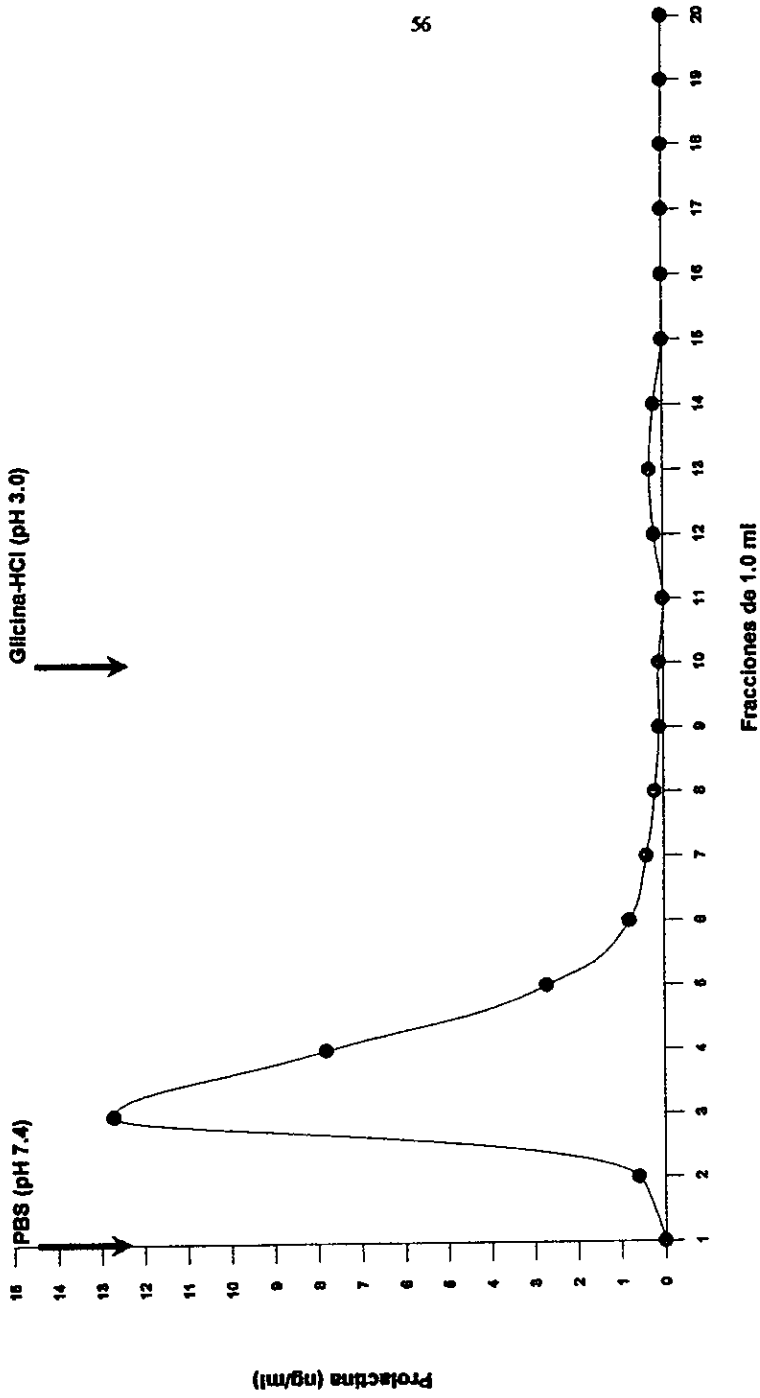


Figura 21. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL.

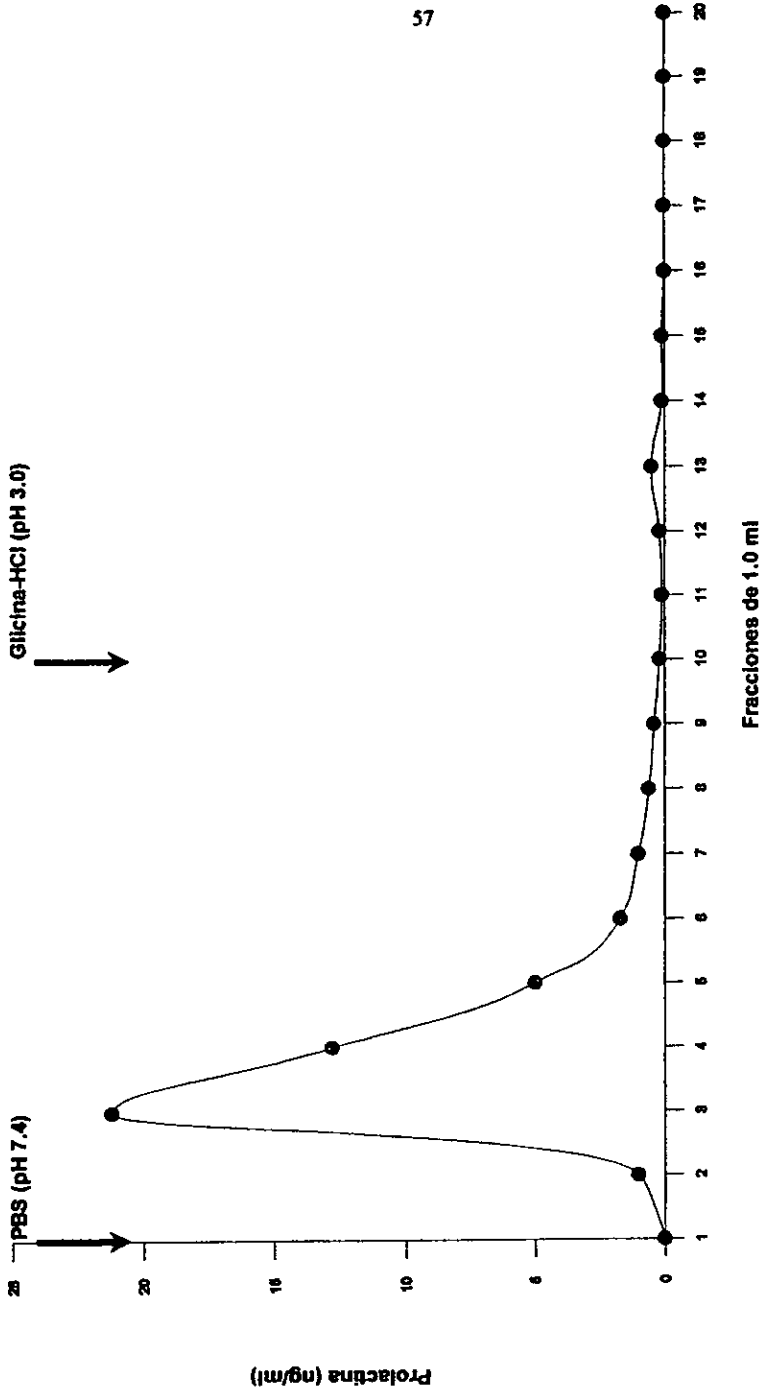


Figura 22. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente con LES y sin autoanticuerpos anti-PRL.

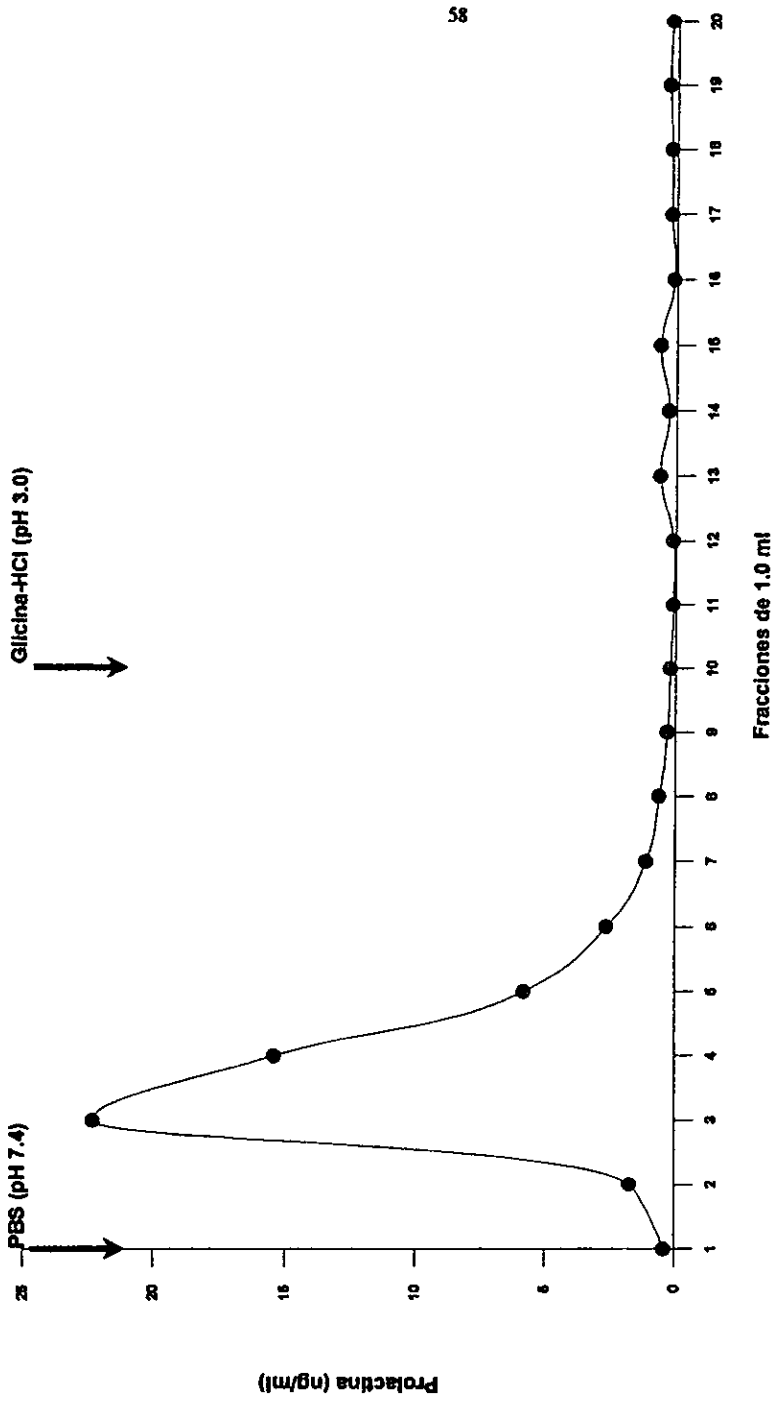


figura 23. Perfil cromatográfico de afinidad con proteína G de la prolactina inmunoreactiva en suero de una paciente embarazada sana y sin autoanticuerpos anti-PRL.

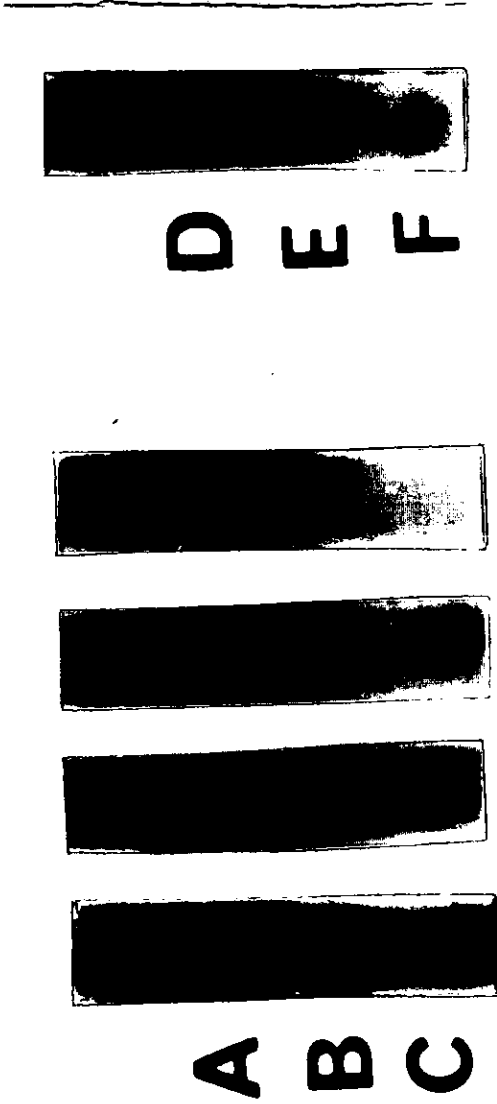
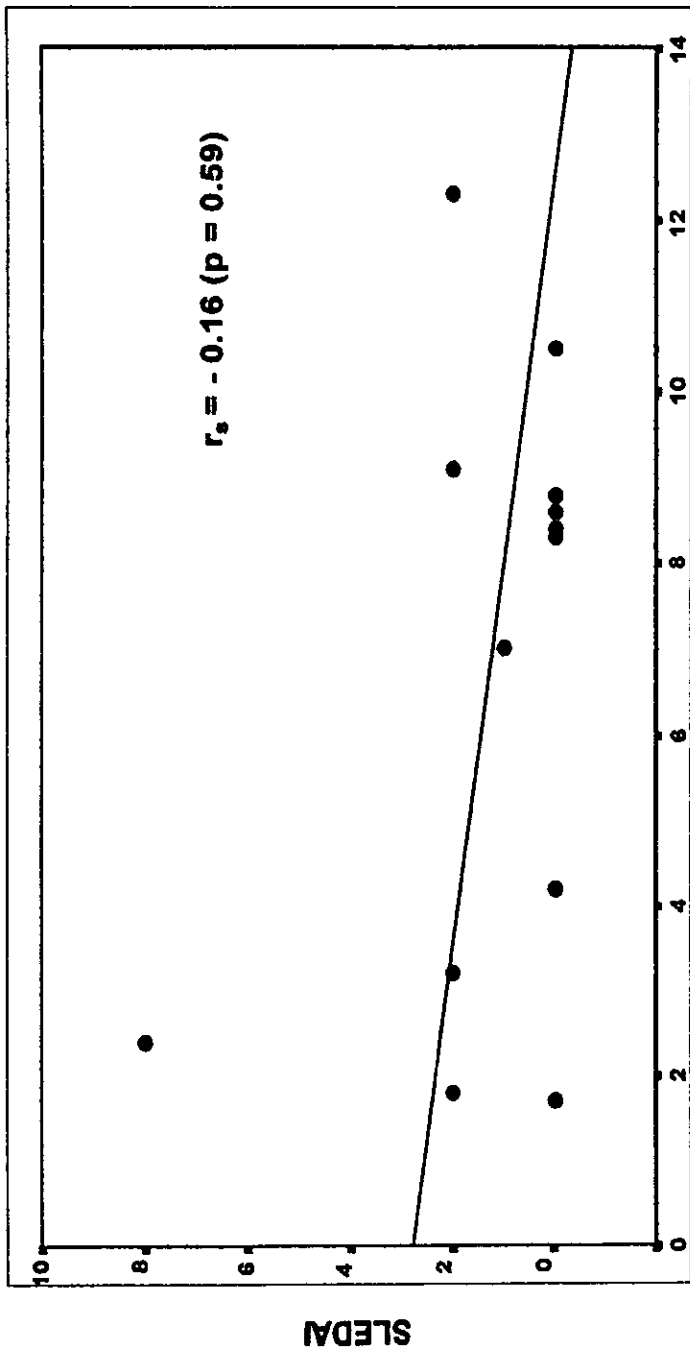


Figura 24. Autoradiografía después de incubar hPRL radiomarcada con 125 I e IgG precipitada con sulfato de amonio de suero libre de prolactina o de anticuerpos anti-PRL humana de conejo. Tiras de la 1 a la 3 es IgG obtenida de pacientes con lupus eritematoso sistémico y con autoanticuerpos anti-PRL, la tira 4 es IgG obtenida de una paciente con lupus eritematoso sistémico y sin autoanticuerpos anti-PRL, y la tira 5 son anticuerpos (IgG) anti-prolactina humana de conejo. Concentraciones de IgG purificada en μ g: A) 25, B) 50 y C) 100. Cantidad de IgG de conejo anti-prolactina humana (comercial) en μ l: D) 5, E) 10 y c) 20.



TITULOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA

Figura 25. Correlación entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL expresados como porcentaje de unión de PRL a IgG y el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) en 13 pacientes con lupus eritematoso sistémico y autoanticuerpos anti-PRL.

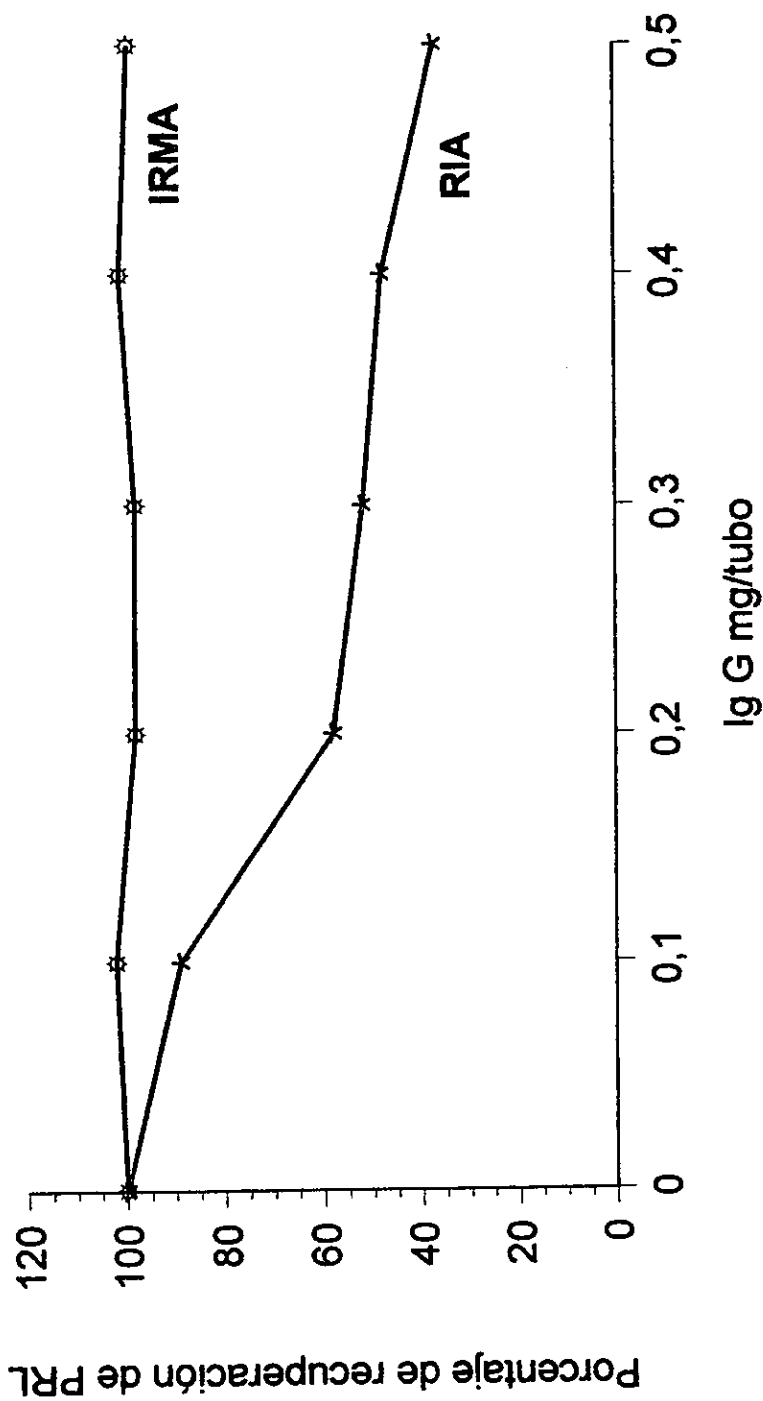


Figura 26. Efecto de la Ig G purificada de un pool de sueros con autoanticuerpos anti-PRL sobre la recuperación de PRL medida por IRMA y RIA de doble anticuerpo.

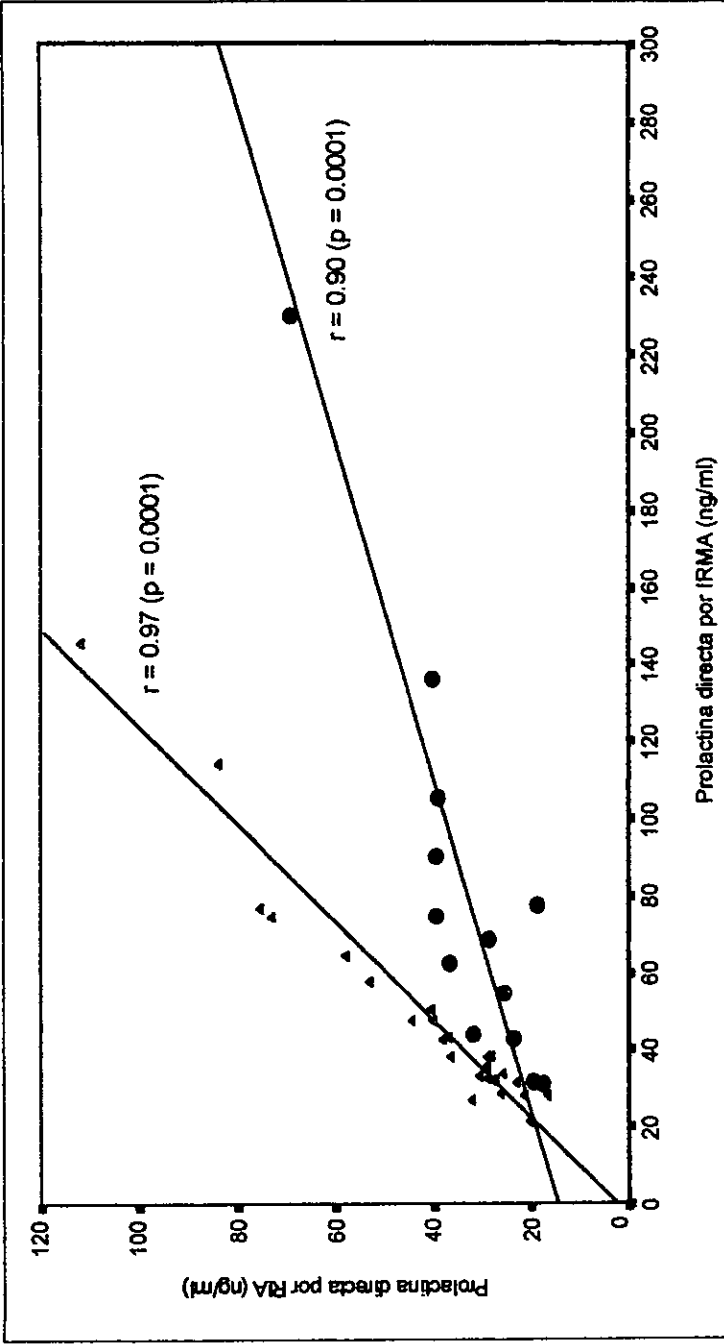


Figura 27. Correlación entre las mediciones de prolactina directa por RIA e IRMA en pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL (triángulos) y en pacientes con autoanticuerpos anti-PRL (círculos).

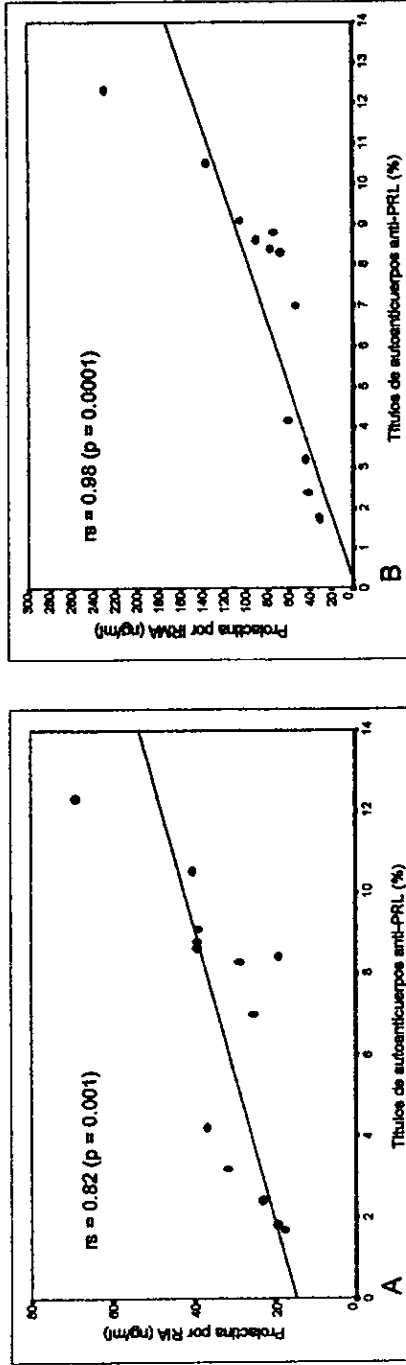


Figura 2B. Correlación entre los niveles séricos de prolactina y los títulos de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con lupus eritematoso sistémico. A. prolactina medida por radioinmunoensayo (RIA) y B. prolactina medida por ensayo inmunoradiométrico (IRMA).

ANEXO 1

FACTORES POTENCIALMENTE RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD LUPICA
CRITERIOS QUE DEBEN REUNIR LOS PACIENTES SIN ACTIVIDAD LUPICA PARA
SER PAREADOS CON LOS PACIENTES CON ACTIVIDAD LUPICA

FACTOR	CRITERIO DE PAREAMIENTO
1. Sexo	Sexo igual al activo.
2. Edad	Más o menos 2.5 años de la edad del activo.
3. Duración de la enfermedad	Más o menos 3 meses de evolución del diagnóstico de la enfermedad al del activo.
4. PRL sérica	Más o menos 2.5 ng/ml de PRL sérica al del activo.
5. Intensidad del tratamiento	El mismo grado de intensidad del tratamiento que del activo. Los grados de la intensidad del tratamiento son: <ol style="list-style-type: none"> 1. Analgésicos y/o anti-inflamatorios no esteroideos. 2. Prednisona \leq 15 mg/día. 3. Prednisona $>$ 15 mg/día. 4. Inmunosupresor (azatioprina, metotrexato, etc.) con o sin el uso prednisona.
6. Tratamiento con cloroquina	El mismo tratamiento con cloroquina al activo (sólo dos categorías: con o sin tratamiento).

ANEXO 2
CRITERIOS REVISADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO *

Criterio	Definición
1. Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado sobre las eminencias malares, con tendencia a la diseminación a partir de los surcos nasolabiales.
2. Eritema discoide	Placas eritematosas elevadas con cicatrización queratótica adherente y tapones foliculares, la cicatrización atrófica puede ocurrir en lesiones viejas.
3. Fotosensibilidad	Eritema cutáneo como resultado de una reacción inusual a la luz del sol, por historia del paciente u observación por un médico.
4. Ulceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, usualmente dolorosas y observadas por un médico.
5. Artritis	Artritis no erosiva que involucren 2 o más articulaciones periféricas, caracterizadas por tumefacción o sinovitis.
6. Serositis	a) Pleuritis. Historia convincente de dolor pleurítico o frote escuchado por un médico o evidencia de derrame pleural. ó b) Pericarditis. Documentada por ECG ó por frote o por evidencia de derrame pericardico.
7. Alteración renal	a) Proteinuria persistente mayor de 0.5 gr./día ó mayor de 3+ si la cuantificación no es realizada. ó b) Cilindros celulares. Pueden ser eritrocitarios, de hemoglobina, granulados, tubulares o mixtos.
8. Alteración neurológica	a) Convulsiones. En la ausencia de drogas o alteraciones metabólicas conocidas, por ejemplo uremia, cetoácidosis ó desequilibrio electrolítico. ó b) Psicosis. En la ausencia de drogas o alteraciones metabólicas conocidas.
9. Alteración hematológica	a) Anemia hemolítica, con reticulocitosis. ó b) Leucopenia, menos de 4,000/mm ³ en dos o mas ocasiones. ó c) Linfopenia, menos de 1,500/mm ³ en dos o mas ocasiones. ó d) Trombocitopenia, menos de 100,000/mm ³ en la ausencia de causas secundarias a drogas.
10. Alteración inmunológica	a) Células LE positivas. ó b) Anti-DNA: Anticuerpos al DNA nativo en títulos anormales. ó c) Anti-Sm: Presencia de anticuerpo al antígeno nuclear Sm. ó d) Prueba serológica falsa positiva para la sífilis, positiva por lo menos durante 6 meses y confirmada por prueba de inmovilización al <i>Treponema pallidum</i> o por absorción con anticuerpos fluorescentes treponemicos.
11. Anticuerpos antinucleares	Un título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o una prueba equivalente durante algún punto en el tiempo y en la ausencia de drogas que se conocen estar asociadas con el síndrome "lupus inducido por drogas".

* La clasificación propuesta está basada en 11 criterios. Con el propósito de identificar pacientes en estudios clínicos, una persona se dice que tiene LES si reúne cuatro o mas criterios de los 11, en forma seriada o simultáneamente durante algún intervalo de observación

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA

Se utilizó proteína A acoplada a sefarosa CL-4B (SIGMA Chemical CO) para inmunoprecipitar los complejos inmunes PRL-IgG. Cada ml de sefarosa hidratada tiene una capacidad de unión de aproximadamente 20 mg de IgG humana. Luego de obtener los complejos inmunes, se cuantifica el porcentaje de PRL unido a IgG.

INMUNOPRECIPITACION DE COMPLEJOS PRL-IgG

En tubos de poliestireno de 12 x 75 mm se depositan 200 μ l de proteína A acoplada a sefarosa (previamente hidratada). Una vez preparados los tubos se agrega 100 μ l de amortiguador fosfato salino (PBS, pH 7.4) conteniendo 0.2 % de azida de sodio, luego se continúa con la siguiente secuencia:

1. Agregar 100 μ l del suero problema e incubar a temperatura ambiente en agitación continua por 5 minutos (durante este proceso la IgG presente en el suero es unida a la proteína A acoplada a sefarosa), se centrifuga a 3,000 r.p.m. a 4 °C durante un minuto y se decanta el sobrenadante.
2. El sedimento (IgG-proteína A acoplada a sefarosa) se lava con 1.5 ml de PBS y se centrifuga del mismo modo que en el paso 1 y este lavado se repite una vez más (durante este proceso son eliminados del tubo las proteínas que no fueron retenidas por la proteína A, quedando solamente la IgG).
3. Después del segundo lavado y una vez decantado el PBS, se resuspende el sedimento con 200 μ l de 0.1 M glicina-HCl (pH 3.0) y se deja incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos en agitación continua (durante este proceso la IgG se separa de la proteína A acoplada a sefarosa al igual que la PRL en caso de encontrarse en complejo con la IgG), se centrifuga del mismo modo que en el paso 1. Luego se toman 100 μ l del sobrenadante y se neutraliza con 2 μ l de 1 M TRIS-HCl (pH 9.0). En el sobrenadante se determina el porcentaje de unión de PRL a la IgG por ensayo inmunoradiométrico (IRMA).

PORCENTAJE DE PRL UNIDA A LA IgG

Se emplearon estuches comerciales para determinar PRL sérica por IRMA (CIS bio internacional). Se realizó la siguiente secuencia:

1. Los 100 µl del sobrenadante neutralizado se depositan en tubos de poliestireno recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino anti-PRL humana y luego se agregaron 48 µl del diluyente comercial. El volumen final de 150 µl se deja incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación continua.
2. Se lava el tubo con 1 ml del amortiguador comercial y se decanta en papel absorbente, este paso se repite 2 veces.
3. Se agregan 100 µl de anticuerpos monoclonales murinos anti-PRL humana marcados con ¹²⁵I (85,000 –89,000 cuentas por minutos (CPM)). Este segundo anticuerpo que sirve para detectar la PRL unida al primer anticuerpo no se solapa, es decir, cada anticuerpo reconoce diferentes epitopos de la PRL humana. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación continua.
4. Se lavan dos veces los tubos como en el paso 2.
5. En el tubo se mide la radioactividad con un contador gamma durante un minuto.
6. El calculo del porcentaje de PRL unida a IgG se hizo con la siguiente formula:

$$\text{CPM del suero problema} - \text{CPM de la unión inespecifica}^* / \text{CPM de CT}^{**} \times 100$$
 - * Para medir las CPM de la unión inespecifica el procedimiento se hizo empleando PBS como control negativo.
 - ** CT = cuentas totales de 100 µl de anticuerpos monoclonales murinos anti-PRL humana marcados con ¹²⁵I.

Se considero que el suero contenía autoanticuerpos anti-PRL cuando el porcentaje de radioactividad excedió la media + 3 desviaciones estándar de 14 sujetos sanos sin hiperprolactinemia y de 10 mujeres sanas embarazadas con hiperprolactinemia.

En adición y para corroborar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (IgG) se hizo cromatografía de filtración en gel y de afinidad en todos los sueros con resultados de porcentaje de PRL unida a IgG mayor al punto de corte antes mencionado.

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

Se utilizó una columna de vidrio de 60 x 1 cm, la cual se empaco con dextrana (Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals) previamente hidratada y lavada con la solución eluyente PBS (pH 7.4) conteniendo azida de sodio al 0.2 % y albúmina bovina al 0.1 %. El empacado de la columna se hizo a 4 °C, se dejó pasar el amortiguador (PBS) a través del lecho del gel (2-3 veces el volumen de la columna) y se dejó estabilizar sin flujo durante 48 horas. La calibración de la columna y la filtración de los sueros se hizo a 4 °C.

Calibración de la columna. Se utilizaron pesos moleculares conocidos (SIGMA, Chemical CO) a concentraciones de 0.2 % en PBS. Se aplicó 2 ml de cada solución a la columna cromatográfica, se recolectaron 70 fracciones de 1.2 ml, midiendo después su absorbancia de cada una de las fracciones eluidas en un espectrofotómetro a 280 nm. Se usaron los siguientes marcadores, azul dextran (2,000 kDa, volumen vacío), albúmina bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12.4 kDa). Después se cromatografió en las mismas condiciones ^{125}I -IgG (150 kDa), ^{125}I -hPRL (23 kDa) y ^{125}I (volumen final), midiendo después las CPM en cada una de las fracciones eluidas.

Cromatografía de los sueros. Se utilizó 1 ml de suero diluido en 1 ml de PBS (volumen total de 2 ml), la muestra se agrega a la columna lentamente e inmediatamente se inicia a coleccionar las fracciones y en cada una de las fracciones se determina la concentración de PRL por IRMA (sensibilidad de la prueba de 0.8 ng/ml).

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEINA A ACOPLADA A SEFAROSA CL-4B

Se utilizó una columna de plástico, se empaco con 1.2 ml de proteína A acoplada a sefarosa CL-4B (SIGMA, Chemical, CO) hidratada y una vez empacada se instaló la columna en cuarto frío a 4 °C. Se aplica a la columna 200 μl de suero diluido con 200 μl de PBS (pH 7.4) conteniendo 0.2 % de azida de sodio y 0.1 % de albúmina bovina y de inmediato se coleccionan fracciones de 0.8 ml por minuto. Las primeras 10 fracciones son eluidas con PBS y las últimas 10 fracciones son eluidas con 0.1 M glicina-HCl (pH 2.7), a los tubos donde se coleccionan éstas fracciones ácidas previamente se les agrega 200 μl de 1 M Tris-HCl (pH 9.0) para neutralizar. En cada fracción coleccionada se les determina la concentración de PRL por IRMA.

Las columnas son regeneradas con PBS, dejando pasar 4-5 volúmenes de la columna, la misma columna se emplea para procesar no más de 10 muestras.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEINA G ACOPLADA A SEFAROSA (high performance)

Se utilizó una columna de plástico, se empaco con 0.7 ml de proteína G acoplada a sefarosa (Pharmacia Biotech) hidratada y una vez empacada se instalo la columna en cuarto frío a 4 °C. Cada ml de gel hidratado con proteína G tiene una capacidad de unión de aproximadamente 25 mg de IgG. Se aplica a la columna 500 µl de suero diluido con 500 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo 0.2 % de azida de sodio y 0.1 % de albúmina bovina y de inmediato se colectan fracciones de 1 ml por minuto. Las primeras 10 fracciones son eluidas con PBS y las últimas 10 fracciones son eluidas con 0.1 M glicina-HCl (pH 3.0), a los tubos donde se colectan éstas fracciones ácidas previamente se les agrega 80 µl de 1 M Tris-HCl (pH 9.0) para neutralizar. En cada fracción colectada se les determina la concentración de PRL por IRMA.

Las columnas son regeneradas con PBS, dejando pasar 4-5 volúmenes de la columna, la misma columna se empleo para procesar no más de 10 muestras.

ANEXO 4

ÍNDICE DE LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES CON LUPUS SLEDAI

Anote la ponderación en la columna de calificación del SLEDAI si la descripción esta presente al tiempo de la visita o en los últimos 10 días previos

Peso	Calificación SLEDAI	DESCRIPCIÓN	DEFINICIÓN
8	_____	Convulsión	Inicio reciente. Excluir causa metabólica, infecciosa o por drogas
8	_____	Psicosis	Capacidad alterada funciones de la actividad normal debido a severos disturbios en la percepción de la realidad. Incluye: alucinaciones, incoherencia, pérdida marcada de las asociaciones, contenido del pensamiento empobrecido, pensamiento ilógico evidente, conducta grotesca, desorganizada o catatónica. Excluir presencia de síndrome urémico o ingesta de drogas.
8	_____	Síndrome orgánico cerebral	Función mental alterada, con deterioro en la orientación, memoria u otra función intelectual de inicio rápido, manifestaciones clínicas fluctuantes. Como alguna de las siguientes: a) alteración del estado de conciencia con capacidad de concentración reducida e incapacidad para mantener atención al medio ambiente. Más, por lo menos 2 de: b) disturbio perceptual, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia durante el día, incrementó o disminución de la actividad psicomotora. Excluir causa metabólica, infecciosa y por drogas.
8	_____	Trastornos visuales	Cambios en retina de LES. Incluye cuerpos citoideos, hemorragia retiniana, exudado seroso o hemorragia en la coroides, o neuritis óptica. Excluir hipertensión arterial sistémica, causas infecciosas o por drogas.
8	_____	Trastornos en nervios craneales	Inicio reciente de neuropatía sensorial o motora que involucre nervios craneales.
8	_____	Cefalea típica	Cefalea persistente y severa; puede ser migrañosa, pero no debe responder a analgésicos narcóticos.
8	_____	Enfermedad vascular cerebral	Síndrome cerebrovascular nuevo. Excluir aterosclerosis.
8	_____	Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos blandos digitales, infarto periangual, hemorragias en astilla, o biopsia o angiografía que apoye vasculitis.
4	_____	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación (por ejemplo, aumento de volumen, tumefacción o sinovitis).
4	_____	Miositis	Debilidad muscular proximal, asociada con elevación de CPK o aldolasa , cambios electromiográficos o biopsia que muestre miositis.
4	_____	Cilindros urinarios	Cilindros de hemoglobina-granulosos o de eritrocitos.
4	_____	Hematuria	> 5 eritrocitos por campo de alto poder. Excluir litos, infección u otras causas.
4	_____	Proteinuria	> 0.5 gr/24 horas. Inicio reciente o incremento de mas de 0.5 gr/24 horas.
4	_____	Piuria	> 5 leucocitos por campo de alto poder. Excluir infección.
2	_____	Eritema malar	Inicio reciente o recurrencia de eritema tipo inflamatorio.
2	_____	Alopecia	Inicio reciente o recurrencia de pérdida anormal de cabello en placas o difuso.
2	_____	Ulceras en mucosas	Inicio reciente o recurrencia de ulceraciones orales o nasales.
2	_____	Pleuritis	Historia convincente de dolor pleurítico con frote o derrame pleural, o engrosamiento pleural.
2	_____	Pericarditis	Historia convincente de dolor pericardico, con al menos uno de los siguientes: frote, derrame o confirmación electrocardiográfica o ecocardiográfica.
2	_____	Complemento bajo	Disminución del CH50, C3 o C4 a un valor menor del limite inferior normal para la prueba de laboratorio.
2	_____	Anticuerpos anti-DNA	> 25 % de unión por la prueba de Farr o mayor al rango normal para la prueba de laboratorio.
1	_____	Fiebre	Mayor de 38 °C después de excluir infección.
1	_____	Trombocitopenia	Menor de 100,000 plaquetas por mm ³ , no debido a drogas.
1	_____	Leucopenia	Menor de 3,000 leucocitos por mm ³ , no debido a drogas.

Calificación total del SLEDAI

ANEXO 5**METODO PARA PREPARAR SUERO LIBRE DE PRL Y SEPARACION DE IgG**

Suero libre de PRL. Se hicieron los siguientes pasos:

1. 1.5 ml de suero se incubaron con 6 ml de 0.1M de glicina-HCl (pH 2.2) conteniendo 0.25 % de dextran 70 y 25 % de carbón activado en polvo, por una hora a 4 °C por una hora en agitación continua. Este proceso disocia la PRL de la IgG y la PRL es adsorbida por el dextran 70 y el carbón activado.
2. La mezcla se centrifuga a 3,000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se neutraliza con 2 M de TRIS-HCl (pH 8.5).

Separación de IgG. Al sobrenadante neutralizado se le hicieron los siguientes pasos:

1. Se agregó sulfato de amonio saturado (para una concentración de sulfato de amonio del 33 %) lentamente y se deja con agitación continua por 15 minutos a 4 °C.
2. La mezcla se centrifuga a 3,000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C y el sedimento se resuspende con 1 – 1.5 ml de PBS (pH 7.4). Este proceso de precipitación con sulfato de amonio se realiza dos veces más.
3. Al final de la tercera precipitación con sulfato de amonio, el sedimento resuspendido en PBS se dializa hasta eliminar completamente el exceso de sulfato de amonio en PBS.
4. Una vez completada la diálisis, se determinó la concentración de IgG por turbidimetría y se ajustó con PBS para dar una concentración final de IgG de 5 mg/ml.

Autoradiografía. Se hicieron los siguientes pasos:

1. En tiras de papel de nitrocelulosa se aplicaron diferentes concentraciones de IgG (25, 50 y 100 µg). Como control positivo se empleó anticuerpos comerciales anti-PRL humana de conejo (DPC), usando 5, 10 y 20 µl. Se incubaron las tiras de papel de nitrocelulosa por 30 minutos a 60 °C.
2. Las tiras de papel de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % (Sveltex) en PBS-Tween por 30 minutos a 37 °C.
3. Las tiras de papel de nitrocelulosa se incubaron con hPRL radiomarcada con ¹²⁵I por una hora a temperatura ambiente y después lavadas 3 veces con PBS-Tween.
4. Una película fotográfica (Kodak) fue expuesta a la tira de papel de nitrocelulosa en un chasis por 72 horas a – 70 °C y posteriormente revelada.

ANEXO 6**METODOS DE EXTRACCION SERICA DE LA PROLACTINA**

Extracción sérica de PRL libre. Se hicieron los siguientes pasos:

1. 400 µl de suero se dejaron a 37 °C por 2 horas.
2. Se agrega al suero 400 µl de polietilenglicol 6,000 (PEG) al 25 % y se agita vigorosamente, la mezcla se centrifuga a 3,000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C.
3. En el sobrenadante se determina la PRL libre por RIA e IRMA.
4. Los estándares de los estuches comerciales se trataron de la misma manera para excluir el efecto del procedimiento de extracción en las mediciones.

El PEG a la concentración final de 12.5 % precipita fracciones de gammaglobulinas > 100 kDa.

Extracción sérica de PRL total. Se hicieron los siguientes pasos:

1. 250 µl de suero se incubaron con 30 µl de 1 N HCl por 30 minutos a temperatura ambiente, este proceso hace que el pH sérico baje a 2.6 aproximadamente para disociar unión de la PRL al autoanticuerpo anti-PRL.
2. Se agregó 340 µl de PEG al 25 % y se agita vigorosamente.
3. Se agrega 60 µl de 2 M Tris-HCl (pH 8.3) para neutralizar la mezcla y se agita nuevamente, se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4 °C.
4. En el sobrenadante se determina PRL total por RIA e IRMA.
5. Los estándares de los estuches comerciales se trataron de la misma manera para excluir el efecto del procedimiento de extracción en las mediciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reeves WH, Lahita RG. Clinical presentation of systemic lupus erythematosus in the adult. In: *Systemic Lupus Erythematosus*. Ed. New York: John Wiley, 1987: 355 - 382.
2. Inman RD. Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 819 - 852.
3. Berezil I. The immunology of prolactin. *Semin Reprod Endocrinol* 1992; 10: 196 - 219.
4. McMurray R, Keisler D, Kanuekel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol* 1991; 147: 780 - 787.
5. Stricker P, Grueter F. Actions du lobe anterieur del'hypophysesur la montee laiteuse. *CR Soc Biol (Par)* 1929; 99: 1978 - 1980.
6. Lamberts SWJ, MacLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990; 70: 279 - 318.
7. Nicoll CS, Maye GL, Russell SM. Structural features of prolactin and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr Rev* 1986; 7: 169 - 203.
8. Golander A, Hurley T, Barret J. Prolactin synthesis by human chorion decidual tissue: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Science* 1978; 202: 311-313.
9. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 751-754.
10. Rosen SW, Weintraub BD, Aaronson SA. Non-random ectopic protein production by malignant cells: direct evidence in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 834-841.
11. DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 1988; 122: 2508-2517.
12. Montgomery DW, Zukoski CF, Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell DH. Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 692-698.
13. De Vito WJ. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hipohysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology* 1989; 47: 87-99.
14. Bernton EW, Beach JE, Holaday JW. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987; 238: 519-521.

15. Schettini G, Lorio T, Meucci O. Interleukin-1- β modulation of prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: involvement of adenylyate cyclase activity and calcium mobilization. *Endocrinology* 1990; 126: 1435-1441.
16. Yamaguchi M, Matsuzaki N, Hirota K. Interleukin 6 possibly induced by interleukin 1 β in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122: 201-205.
17. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac Rec* 1930; 47: 119 - 129.
18. Nagy E, Berczi I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 1978; 89: 530 - 537.
19. Nagy E, Berczi I, Friesen HG. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 102: 351-357.
20. Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 1983; 6: 231-243.
21. Spangelo BL, Hall NR, Ross PC, Goldstein AL. Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A-induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin. *Immunopharmacology* 1987; 14: 11-20.
22. Spangelo BL, MacLeod RM. The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab* 1990; 1: 408 - 412.
23. Jones TH, Price A, Justice S, Chapman K. Interleukin-6 secretion by human pituitary adenomas in vivo (abstr). *J Endocrinol* 1990 (Suppl); 127: 86.
24. Bemton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Finn HG. Release of multiple hormones by direct action of interleukin-1 on pituitary cell. *Science* 1987; 238: 519 - 521.
25. Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125: 575 - 577.
26. Russell DH, Kibler R, Matrisian L, Larson DF, Poulos B, Magun BE. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: Antagonism of prolactin binding by cyclosporine. *J Immunol* 1987; 134: 3021 - 3031.
27. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor super-family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6934 - 6938.

28. Hatfill SJ, Kirby R, Hanley M, Rybicki E, Bohm L. Hyperprolactinemia in acute myeloid leukemia and indication of ectopic expression of human prolactin in blast cell of a patient of subtype M4. *Leuk Res* 1990; 14: 57 - 62.
29. Berczi I, Nagy E. The effect prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function. In: Kovacs K, ed. *Hormones and immunity*. Norwell: MTP Press 1987: 145 - 170.
30. Cross RJ, Campbell JL, Rozsman TI. Potentiation of antibody responsiveness after the transplantation of a syngenic pituitary gland. *J Neuroimmunol* 1989; 25: 29 - 35.
31. Buskila D, Berezin M, Gur H, Alosachie Y, Terryberry JW, Barka N, et al. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995; 8: 415 - 424.
32. Allen SH, Sharp GC, Wang G, Conley C, Takeda Y, Conroy SE, et al. Prolactin levels and antinuclear antibody profiles in women tested for connective tissue disease. *Lupus* 1996; 5: 30 - 37.
33. Ferrari C, Boghen M, Parrachi A. Thyroid autoimmunity in hyperprolactinemic disorders. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 35 - 41.
34. Hedner LP, Bynke G. Endogenous iridocyclitis relieved during treatment with bromocriptine. *Am J Ophthalmol* 1985; 100: 618 - 619.
35. Asa SL, Bilbao JM, Kovacs K, Josse RG, Kreines K. Lymphocytic hypophysitis of pregnancy resulting in hypopituitarism: A distinct clinicopathologic entity. *Ann Intern Med* 1981; 95: 166 - 171.
36. Lever EG, McKerron CG. Auto-immune Addison's disease associated with hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol* 1984; 21: 451 - 457.
37. Lavalle C, Loyo E, Paniagua R. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 268 - 272.
38. Folomeev M, Prokaeva T, Nassonova V. Prolactin levels in men with SLE and RA. *J Rheumatol* 1990; 17: 1569 - 1570.
39. Puzner R, Urowitz MB, Gladman DD. Prolactin levels in systemic lupus erythematosus (Abst). *Arthritis Rheum* 1992; 35: S239.
40. Jara LJ, Gomez-Sanchez C, Silveira LH, Martinez-Osuna P, Vassey FB, Espinoza LR. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992; 303: 222 - 226.

41. Davis WE, Quinet R, Winters E, Cooper ES, Chambers R, Serebro L, et al. Serum interleukin 6 (IL 6) and prolactin (PRL) do not correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE). (Abstr). *Lupus* 1995 (suppl 2); 4: 67.
42. Buskila D, Lorber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 629 - 632.
43. Puzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Cough J. Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; 21: 2064 - 2067.
44. Neidhart M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1996; 23: 476 - 481.
45. Ostendorf B, Fischer R, Santen R, Schmitz-Linneweber B, Specker Ch, Schneider M. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus ?. *Scand J Rheumatol* 1996; 25: 97 - 102.
46. Batrinos ML, Panitsa-Fafila C, Tsiganou E, Liapi C. Incidence and characteristics of microprolactinomas (3 - 5 mm) in 4199 women assayed for prolactin. *Horm Metab Res* 1992; 24: 384 - 391.
47. Conconi MV, Walker AM. Chloroquine affects prolactin secretion and golgi morphology in the mammoth. *Endocrinology* 1984; 114: 725 - 734.
48. Melez KA, Boegel WA, Steinberg AD. Therapeutic studies in New Zealand mice. VII. Successful androgen treatment of NZB/NZW females of different ages. *Arthritis Rheum* 1980; 12: 41 - 47.
49. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 241 - 248.
50. Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron E, Bach J. Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 454 - 457.
51. Katz E, Adashi Y. Hyperprolactinemic disorders. *Clin Obstet Gynecol* 1990; 33: 622 - 639.
52. Lavalley C, Graef A, Baca V, Ramirez-Lacayo M, Blanco-Favela F, Ortiz O. Prolactin and gonadal hormones: A key relationship that may have clinical, monitoring and therapeutic implications in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2: 71 - 75.

53. Rabinovich CE, Schanberg LE, Kredich DW. Intravenous immunoglobulin and bromocriptine in the treatment of refractory neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (Abst) *Arthritis Rheum* 1990; 33: R22.
54. McMurray RW, Allen SH, Braun AL, Rodriguez F, Walker SE. Logstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: Possible hormonal stimulation of an autoimmune disease. *J Rheumatol* 1994; 21: 843 - 850.
55. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker S. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1995; 22: 2084 - 2091.
56. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory test*. 3rd ed. Washington: AACC Press 1990.
57. Hess EV, Mongey A. Drug related lupus: The same asor different from idiopathic disease? In: Lahita RG, ed. *Systemic Lupus Erythematosus* 2nd ed. New York: John Wiley, 1992: 869 - 880.
58. Davidson BL, Gilliam JN, Lipsky PE. Cimetidine associated exacerbation of cutaneous lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1982; 142: 166 - 167.
59. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1226 - 1229.
60. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 438 - 445.
61. Posner BI, Kelly PA, Shiu RPC, Friesen HG. Studies of insulin, growth hormone and binding prolactin: Tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 1974; 95: 521 - 531.
62. Sievertsen GD, Lim VS, Nakawatase C, Frohmn LA. Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 846 - 852.
63. Hirata Y, Ishizu H, Ouchi N. Insulin autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycemia. *J Jpn Diabetes Soc* 1970; 13: 312 - 320.
64. Folling I, Norman N. Hyperglycemia, hipoglycemia attacks, and production of anti-insulin antibodies without previous known immunization: Immunological and functional studies in a patient. *Diabetes* 1972; 21: 814 - 826.

65. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community: Incidence, prevalence, outcome and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Inter Med* 1974; 134: 1027 - 1035.
66. Tan EM, Cohen AS, Fries JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271 - 1277.
67. Bombardier C, Gladman D, Urowitz M, Caron D, Chang CH and The Committee on Prognosis Studies in SLE: Derivation of the SLEDAI: A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630 - 640.
68. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 434 - 437.
69. Schneider AB, Pervos R. Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effects of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 126 - 137.
70. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: Bioassay and clearance studies of PRL-Immunoglobulin G Complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3107 - 3110.
71. Blanco F, Quintal G, Leaños A. Analysis of the association between prolactin and the activity in SLE. One viewpoint of the power of the study. *J Rheumatol* (enviado).

Este trabajo fue financiado en parte por CONACYT

No. Registro de Becario: 96079

No. Registro de Financiamiento:

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**