

11282

4



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACION

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

AUTOANTICUERPOS ANTI - PROLACTINA:  
BIOENSAYO Y ACLARAMIENTO PLASMATICO  
DEL COMPLEJO PROLACTINA-IgG OBTENIDO  
DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
SISTEMICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS  
P R E S E N T A

DR. ALFREDO LEAÑOS MIRANDA

ASESOR: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA



MEXICO, D. F.

FEBRERO 2001



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

***AUTOANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA: BIOENSAYO Y  
ACLARAMIENTO PLASMÁTICO DEL COMPLEJO  
PROLACTINA-IgG OBTENIDO DE PACIENTES CON  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS**

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

**DR. ALFREDO LEAÑOS MIRANDA**

**ASESOR: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA**

**MÉXICO, D. F.**

**FEBRERO 2001**

El contenido de esta tesis fue aceptado para su publicación en la Revista *Arthritis and Rheumatism*: **Biologic Activity and Plasmatic Clearance of Prolactin-IgG Complex in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum 2001.**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Autoinmunidad de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la tutoría del Dr. Francisco Blanco Favela y el Comité Tutorial formado por la Dra. Julieta Ivonne Castro Romero y el Dr. Carlos Lavalle Montalvo.

Agradezco al **Instituto Mexicano del Seguro Social**, Institución en la cual laboro como Médico Adscrito en el Hospital General de Zona No.1-A "Los Venados", el apoyo a través del programa de becas para realizar estudios de posgrado y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca recibida durante mis estudios de posgrado (Registro de Becario No. 96079).

Agradezco al **National Hormone and Pituitary Program at the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (Dr. A.F. Parlow)** el donativo de prolactina humana y los anticuerpos específicos.

Este trabajo fue financiado en parte por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 0706P-M9506)**, México.

## ***Agradecimientos***

**Al Dr. Francisco Blanco Favela** por las facilidades y apoyo para realizar este trabajo.

**A los integrantes del Jurado: Dr. Fernando Larrea G., Dr. Dante Amato M., Dr. Alfredo Antonio Ulloa A., Dra. María del Carmen Clapp M., Dr. Rubén Burgos y al Dr. César González B.**

**A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), encabezado por el Dr. Roberto Kretschmer Schmid,** quienes participaron de alguna forma u otra en la realización de esta tesis y estimularon mi superación personal y profesional.

**A todas las pacientes** por su valiosa colaboración anónima y desinteresada que hicieron posible este trabajo de investigación. Muchas gracias.

## ***Dedicatorias***

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 sabios consejos.

A mis hermanos, muy especialmente a **Blanca Leños Miranda, Guadalupe Leños Miranda y Graciela Leños Miranda** por su presencia de siempre, paciencia y apoyo incondicional.

A mis amigos y amigas, que no necesito mencionar, pues al decir que han estado conmigo en los buenos y malos momentos, apoyándome en todo lo que emprendo, dándome su afecto y por ser fuente de inspiración constante e inagotable se sabrán aludidos.

*Lo que no me mata me hace más fuerte*

*Nietzsche*

## ***Contenido***

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| Resumen                                                | 1  |
| Introducción                                           | 4  |
| Justificación                                          | 11 |
| Planteamiento del problema                             | 12 |
| Objetivos                                              | 14 |
| Sujetos, Material y Métodos                            |    |
| Pacientes y controles                                  | 15 |
| Pruebas hormonales                                     | 15 |
| Cromatografía de filtración en gel                     | 16 |
| Cromatografía de afinidad                              | 19 |
| Células de linfoma Nb2 dependientes de PRL (bioensayo) | 20 |
| Western blot                                           | 25 |
| Estudios de aclaramiento plasmático de la PRL          | 26 |
| Análisis estadístico                                   | 26 |
| Resultados                                             |    |
| Descripción general                                    | 28 |
| Cromatografía de filtración en gel                     | 30 |
| Cromatografía de afinidad                              | 30 |
| Mediciones de PRL sérica por IRMA, RIA y Nb2           | 34 |
| Relación Nb2/IRMA de las isoformas de la PRL           | 34 |
| Análisis por Western blot                              | 36 |

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Inmunorreactividad por IRMA de la PRL glicosilada                                                                                                                      | 36 |
| Efecto de las diferentes muestras con PRL en la proliferación de células Nb2                                                                                           | 40 |
| Aclaramiento plasmático del complejo PRL-IgG                                                                                                                           | 42 |
| Discusión                                                                                                                                                              | 44 |
| Referencias                                                                                                                                                            | 53 |
| Anexos                                                                                                                                                                 |    |
| Anexo 1. Criterios revisados para la clasificación del LES                                                                                                             | 64 |
| Anexo 2. Índice de la actividad de la enfermedad en pacientes con LES                                                                                                  | 65 |
| Anexo 3. Cromatografía de afinidad con concanavalina A                                                                                                                 | 66 |
| Producción científica personal publicada y aceptada para publicación<br>concerniente a la línea de investigación sobre prolactina y autoanticuerpos<br>anti-prolactina | 67 |

## ***Abreviaturas***

|                        |                                                                                                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ED<sub>50</sub></b> | Dosis efectiva al 50%                                                                                                                 |
| <b>hGH</b>             | hormona del crecimiento humana                                                                                                        |
| <b>hPRL</b>            | Prolactina humana                                                                                                                     |
| <b>IgG</b>             | Inmunoglobulina G                                                                                                                     |
| <b>IRMA</b>            | Ensayo inmunoradiométrico                                                                                                             |
| <b>K<sub>av</sub></b>  | Coefficiente de partición                                                                                                             |
| <b>KDa</b>             | Kilodaltones                                                                                                                          |
| <b>LES</b>             | Lupus eritematoso sistémico                                                                                                           |
| <b>LP</b>              | Lactogeno placentario                                                                                                                 |
| <b>NIDDK</b>           | National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center) |
| <b>PBS</b>             | Amortiguador salino de fosfatos                                                                                                       |
| <b>PRL</b>             | Prolactina                                                                                                                            |
| <b>rechPRL</b>         | Prolactina humana recombinante                                                                                                        |
| <b>RIA</b>             | Radioinmunoensayo                                                                                                                     |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Electroforesis en gel de poliacrilamida (con duodecil sulfato de sodio)                                                               |
| <b>SLEDAI</b>          | Índice de la actividad de la enfermedad en lupus eritematoso sistémico                                                                |

## **Resumen**

**Introducción.** La prolactina (PRL) es una hormona peptídica con acción inmunomoduladora. El 15 – 30% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) tienen hiperprolactinemia y los niveles séricos de PRL están asociados a la actividad lúpica.

La presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG se han encontrado en el 40.7% de los pacientes con LES e hiperprolactinemia idiopática, los cuales se detectan en la sangre formando un complejo con la PRL (PRL-IgG), con un peso molecular aparente de 150 kDa (big big PRL) por filtración en gel. La presencia de los autoanticuerpos anti-PRL se asocia al estado hiperprolactinémico y existe una correlación positiva entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL, lo que sugiere que los autoanticuerpos son la causa de la hiperprolactinemia en un subgrupo de pacientes, especialmente en aquellos con niveles séricos muy elevados de PRL y sin una causa aparente para explicar la hiperprolactinemia (hiperprolactinemia idiopática). Además, los pacientes con hiperprolactinemia idiopática y autoanticuerpos anti-PRL presentan menor actividad lúpica (clínica y serológica) que los pacientes con hiperprolactinemia idiopática sin autoanticuerpos anti-PRL (cuya forma predominante circulante en sangre es la PRL monomérica o little PRL), lo que indica que la actividad biológica de la PRL esta bloqueada por el autoanticuerpo anti-PRL.

Para explorar los mecanismos de la menor actividad clínica en los pacientes con hiperprolactinemia y autoanticuerpos anti-PRL decidimos estudiar la actividad biológica *in vitro* del complejo PRL-IgG, así como, estudiar el aclaramiento plasmático del complejo PRL-IgG para explicar el estado hiperprolactinémico.

**Objetivo.** Determinar la actividad biológica *in vitro* (células Nb2) y el aclaramiento plasmático en ratas del complejo PRL-IgG obtenido de pacientes con LES.

**Diseño.** Estudio experimental.

**Sitio del estudio.** Laboratorio de Autoinmunidad de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional, Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Métodos y pacientes.** Se estudiaron 27 mujeres con LES e hiperprolactinemia. Fueron agrupadas en tres categorías: grupo I (ocho pacientes con autoanticuerpos anti-PRL), grupo II (doce pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL y sin actividad lúpica), y grupo III (siete pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL y con actividad lúpica. Además, el suero de cinco mujeres normoprolactinémicas sanas y siete mujeres con adenoma hipofisiario productor de PRL también fueron estudiados.

La PRL sérica fue caracterizada por ensayo inmunoradiométrico (IRMA), radioinmunoensayo (RIA), bioensayo en células Nb2, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad para inmunoglobulina G (IgG), electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) – Western blot, así como su aclaramiento plasmático en ratas.

**Resultados.** En los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, la mayor parte de la PRL ( $83.8 \pm 6.4\%$ ) eluyó por filtración en gel como “big big PRL” (peso molecular aparente de 150 kDa), la cual se encontró unida no covalentemente a la IgG en el  $45.2 \pm 10.6\%$  y por Western-blot solamente estuvo presente la PRL de 23 kDa. En cambio, el suero de los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL, la mayor parte de la PRL ( $86.2 - 100\%$ ) eluyó por filtración en gel como “little PRL”, y por Western-blot se detectó principalmente PRL de 23 kDa (no glicosilada), como también y en menor cantidad PRL de 25 kDa (glicosilada). En siete de las ocho pacientes con autoanticuerpos anti-PRL no hubo actividad lúpica, en ninguna existían causas asociadas a la elevación de la PRL, como tampoco ninguna presentaba trastornos menstruales. En cambio, las pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL, la frecuencia de causas secundarias de hiperprolactinemia, como de trastornos menstruales fueron significativamente mayores ( $p \leq 0.05$ ). La media de la relación Nb2/IRMA del suero total de las pacientes con autoanticuerpos anti-PRL fue de  $1.46 \pm 0.26$ , semejante a la obtenida en las fracciones por filtración en gel que contenían el complejo PRL-IgG ( $1.50 \pm 0.31$ ), esta relación fue significativamente mayor que la del suero total sin autoanticuerpos anti-PRL ( $0.81 - 0.95$ ), como de las fracciones

por filtración en gel que contenían "little PRL" (0.76 – 0.80) ( $p \leq 0.02$ ). De forma similar, el complejo PRL-IgG fue 1.55 veces más activo sobre las células Nb2 que la PRL humana hipofisiaria que contenía 12.1% de PRL en forma glicosilada (25 kDa), pero esta actividad fue semejante a la PRL humana recombinante que prácticamente no contenía PRL glicosilada (0.23%) y al igual que el complejo PRL-IgG, sólo se detectó la PRL de 23 kDa por Western-blot. La concentración de PRL determinada por IRMA en suero total fue semejante a la determinada por células Nb2 en todos los grupos estudiados, en cambio, la concentración de PRL determinada por RIA fue significativamente menor sólo en el suero de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL que la determinada por IRMA o por bioensayo en células Nb2 ( $p \leq 0.008$ ). El aclaramiento plasmático de la PRL del suero de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL fue significativamente más retardado que de la PRL del suero de los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL ( $p \leq 0.001$ ).

**Conclusiones.** Se demostró que el complejo PRL-IgG de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL esta formado por la unión no covalente de una IgG a la PRL de 23 kDa y que tiene una actividad biológica completa *in vitro*. Estos datos sugieren que el complejo PRL-IgG no ejerce su actividad biológica *in vivo* debido a su alto peso molecular que le impide atravesar las paredes capilares para llegar a sus células blanco. De forma semejante, debido al alto peso molecular del complejo PRL-IgG, el aclaramiento plasmático de la PRL esta disminuido y esto tiende al desarrollo de la hiperprolactinemia.

## ***Introducción***

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune compleja que afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer / hombre de 9:1) entre los 20 a 40 años de edad (1), este predominio al sexo femenino ha sido atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de los estrógenos (2). El LES también tiene una tendencia de inicio o exacerbación durante el embarazo o en el periodo post-parto (3,4), condiciones que se acompañan de niveles elevados de prolactina (PRL) sérica (5,6) .

El LES es una enfermedad de etiología desconocida, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y alteraciones inmunológicas, las cuales están caracterizadas por anomalías tanto en los linfocitos B como T, especialmente durante la actividad de la enfermedad. El suero de los pacientes con LES se caracteriza por la reactividad que presenta a una gran variedad de autoantígenos, particularmente a nucleoproteínas, entre estos autoanticuerpos se encuentran los que unen DNA, Sm, RNP, Ro, La e histonas que han sido extensamente estudiados. Algunos autoanticuerpos como anti-dsDNA y anti-Sm muestran especificidad para LES, otros autoanticuerpos están asociados con manifestaciones particulares de la enfermedad, por ejemplo, los autoanticuerpos anti-Ro están asociados al LES cutáneo subagudo, lupus neonatal y lupus seronegativo, y los autoanticuerpos anti-La están presentes en los pacientes con LES que tienen síndrome de Sjögren.

Las alteraciones en la inmunorregulación en el LES pueden ser debidas a factores genéticos, ambientales y hormonales, lo que permite la expresión clínico-serológica y también puede servir para identificar subgrupos clínicos con diferente gravedad y pronóstico.

La asociación del LES con una amplia variedad de autoanticuerpos es la 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 los autoanticuerpos circulantes. La pregunta de si estos autoanticuerpos son inducidos por

antígenos o están codificados en los genes de las células de las líneas germinales esta en debate, pero la respuesta puede ser que ocurran ambas cosas.

La hormona lactogénica de la hipófisis anterior PRL, tiene efectos sobre la respuesta inmune (7), se ha demostrado que exacerba la actividad de la enfermedad en ratones hembras Nueva Zelanda negras X Nueva Zelanda blancas (NZB X NZW) que padecen una enfermedad semejante al LES (8,9).

La actividad biológica de la PRL fue reconocida por primera vez en 1929, cuando al administrar extractos de hipófisis a conejas ooforectomizadas se les provocaba secreción láctea (10). La PRL es una de las hormonas más versátiles de la hipófisis en términos de acciones biológicas. Más de 100 acciones diferentes de la PRL han sido documentadas en animales vertebrados (11), que incluyen entre otras: desarrollo mamario e inicio de la lactancia en mamíferos, osmorregulación en peces, conductas de anidación en pájaros, crecimiento y metamorfosis en anfibios. Estas acciones, son mucho más que las acciones reportadas en conjunto para el resto de las hormonas adeno-hipofisiarias. Además, la PRL modula las funciones del sistema inmune (12).

La PRL es una hormona proteica de 199 aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa (13,14), fue descubierta en la glándula hipofisiaria (10), secretada por una clase de células con tinción acidofílica, conocidas hoy como mamotropos y mamosomatotropos (15), y fue considerada como una hormona de origen hipofisiaria exclusivo. En los últimos años, se ha demostrado la presencia de PRL y moléculas PRL-like en una gran variedad de tejidos. De los tejidos no hipofisiarios, la placenta es la fuente más abundante de PRL (16), la hormona es sintetizada por las células de la decidua placentaria y es idéntica a la PRL hipofisiaria en propiedades químicas, biológicas e inmunológicas. La PRL se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y médula espinal de los mamíferos (17-18). La PRL y las moléculas PRL-like son producidas también por diferentes tipos de células del sistema inmune: timocitos humanos (19), células linfoblastoides-B IM-9-p3 (20), linfocitos T (21). Otros órganos y tejidos en los cuales la PRL-like inmunorreactiva se ha encontrado incluyen: glándula mamaria, glándula adrenal, cuerpo lúteo, próstata, testículo, glándula uretral, glándula lacrimal, glándula sudorípara, islotes pancreáticos e intestino (21-27).

El gen de la PRL se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, compuesto de cinco exones y cuatro intrones largos, es más grande que el gen de la hormona del crecimiento (16 kb vs. 2 kb) debido a los intrones largos. En todos los exones e intrones del gen de la PRL de rata existe más de un sitio posible de empalme (splicing) (28), con la posibilidad de dar diferentes variantes de PRL por diferentes sitios de empalme del mRNA.

La PRL se sintetiza como una pre-hormona de 227 aminoácidos en muchas especies de mamíferos (29), la hormona madura se deriva de esta molécula precursora por ruptura proteolítica del péptido señal de 28 aminoácidos (30,31). El mRNA de la PRL cerebral es idéntico al mRNA de la PRL hipofisiaria (32). Las células linfoides y la decidua humana expresan un mRNA de la PRL aproximadamente 150 nucleótidos mayor que el mRNA de la PRL hipofisiaria, pero el precursor de la PRL sintetizada por estos tejidos parece idéntico al precursor de la PRL hipofisiaria (19,33).

La secreción normal de PRL esta bajo un control inhibitorio tónico por la dopamina hipotalámica y su inhibición esta sujeta a estímulos internos y externos. La síntesis y secreción de la PRL son estimulados por estrógenos, embarazo, estimulación del pezón, serotonina, hormona liberadora de la tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, estrés, antagonistas dopaminérgicos (clorpromacina, metoclopramida, etc.) e interleucina 1 (IL-1) y 6 (IL-6) (34-36). La secreción de PRL es inhibida por corticoesteroides, progestágenos, andrógenos, dopamina, opiáceos y agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) (5, 37-41). Las interacciones hormonales entre la PRL, estrógenos y andrógenos son bidireccionales, en donde los estrógenos estimulan y los andrógenos inhiben la secreción de PRL, en tanto que la PRL suprime la producción de estrógenos y andrógenos en humanos, ocasionando amenorrea o impotencia respectivamente.

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 (42), este estudio se considera como el primero en indicar el papel de la PRL en la fisiología tímica. 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 (43,44). No fue hasta

1983 (45) que 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 y la formación de anticuerpos dirigidos contra eritrocitos de carnero y lipopolisacáridos bacterianos) (45,46).

La interrelación entre PRL y el sistema inmune ocurre a niveles celulares y moleculares. Las citocinas influyen en la secreción de PRL por células hipofisiarias, la secreción de PRL es estimulada por IL-6 e IL-1 (47-50). La IL-6 puede actuar como un regulador parácrino o endocrino de la secreción de PRL (50). Las células linfoides expresan en la superficie celular receptores para PRL (51), 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) (52). La PRL ha mostrado regular la transcripción de genes en linfocitos (53), estimula la expresión de receptores de IL-2 (54), induce el factor 1 regulador de interferón (55), y es esencial para que la IL-2 induzca linfoproliferación en linfocitos T (56), sugiriendo que la PRL es un factor de proliferación autócrino o parácrino en los linfocitos.

Varios experimentos en animales han demostrado aumento de la producción de autoanticuerpos en roedores hiperprolactinémicos (8,46,57,58). En los ratones NZB X NZW F1 al inducirles hiperprolactinemia crónica por trasplante singénico de glándulas hipofisiarias, incrementan la albuminuria, aumentan los complejos inmunes gp-70-anti-gp70, desarrollan hipergammaglobulinemia y tienen una mortalidad temprana secundaria a nefritis por complejos inmunes (8). 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 mostraron autoanticuerpos (0/19) (59). Allen y colaboradores, hicieron determinaciones de PRL en el suero de pacientes que se les había solicitado anticuerpos antinucleares realizados en un laboratorio de referencia de anticuerpos antinucleares, encontrando que la frecuencia de

hiperprolactinemia fue mayor en sueros con anti-dsDNA en mujeres con  $\leq 50$  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%,  $p = 0.03$ ) (60).

La hiperprolactinemia puede tener varias causas: 1) embarazo, 2) prolactinoma, 3) macroadenomas hipofisarios no funcionales y tumores paraselares, tales como meningioma y craneofaringioma que comprimen la silla turca o hipotálamo, 4) drogas que estimulan la secreción de PRL como los antagonistas dopaminérgicos e inhibidores de la recaptación de catecolaminas, 5) hipotiroidismo, 6) enfermedades de la pared torácica, 7) alteraciones hepáticas y 8) alteraciones renales. Cuando no se encuentra una causa explicable o probable del estado hiperprolactinémico se le llama hiperprolactinemia idiopática (5,6).

El estado hiperprolactinémico se ha relacionado a múltiples alteraciones autoinmunes, como tiroiditis, uveítis, hipofisitis linfocítica, insuficiencia suprarrenal autoinmune y LES (61-64). La primera publicación que describió la asociación entre LES en hombres y niveles séricos elevados de PRL fue publicado por Lavalle en 1987, luego por Folomeev en 1990 y posteriormente por otros autores (65-67). 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% (68-72) y sólo Ostendford (73) ha sido el único en reportar una frecuencia de hiperprolactinemia del 2.2%. En contraste, sólo se espera que tengan hiperprolactinemia el 3% de las mujeres entre los 14 a 43 años de edad (74).

En estudios realizados en modelos animales existe suficiente evidencia de que la PRL ejerce un efecto dañino en enfermedades autoinmunes (8,9,58), 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/o serológica (60,68,72) y otros no (70,71,73), estas inconsistencias obedecen entre otras al poder estadístico de los estudios, a la falta de control en las variables que influyen en la actividad lúpica, como de fármacos empleados comúnmente en LES y que disminuyen los niveles séricos de PRL, como es el caso de la cloroquina y los corticoesteroides (75,76). Un estudio reciente que involucró a un gran número de pacientes con LES, mostró que el

incremento en los niveles séricos de PRL fue un factor asociado independientemente a la actividad lúpica en modelos de regresión logística (77).

La introducción de las pruebas para determinar la concentración sérica de PRL humana durante los años 70, trajo consigo la definición del síndrome hiperprolactinéxico (trastornos menstruales, infertilidad y galactorrea en la mujer e impotencia y pérdida de la libido en hombres). Estudios durante los últimos años han mostrado que la PRL existe en varias formas moleculares, algunas resultan de modificaciones post-traduccionales y otras por factores genéticamente determinados. Esto ha sugerido que la PRL es una pro-hormona, la cual es sintetizada como una molécula precursora y después modificada a diferentes formas (fragmentación, glucosilación, fosforilación, deamidación, sulfatación, formación de dímeros y polímeros, o a la unión con otras proteínas), las cuales pueden afectar sus propiedades biológicas en forma independiente a su inmunoreactividad. En el suero de sujetos normales y en la mayoría de pacientes con hiperprolactinemia, la mayor inmunoreactividad de la PRL por cromatografía de filtración en gel se encuentra en forma su monomérica, con un peso molecular de 23 kDa ("little PRL"), cantidades menores se encuentran junto al volumen vacío ("big big PRL", > 100 kDa) o en una posición que corresponde al peso molecular entre 45 a 50 kDa ("big PRL") (78-82). Varios autores han reportado un reducido número de pacientes con hiperprolactinemia asintomática, debida a la presencia predominante de big big PRL circulante (78-80), llamada también macroprolactinemia (81,83). Los autoanticuerpos anti-PRL han sido detectados en el suero de pacientes con hiperprolactinemia idiopática (84,85), los cuales no presentaban síntomas clínicos de hiperprolactinemia, tales como amenorrea y galactorrea, similar a lo que sucede en pacientes con macroprolactinemia. Hattori y cols (86), reportaron en pacientes con hiperprolactinemia idiopática sin trastornos autoinmunes una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en el 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 hiperprolactinéxicos fue menor: 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 macroprolactinemia tiene similitud a la hiperprolactinemia relacionada a los autoanticuerpos anti-PRL, es decir una PRL circulante con peso molecular grande ( $> 100$  kDa) y la falta de síntomas clínicos de hiperprolactinemia. Independientemente de la naturaleza de la big big PRL, la ausencia de síntomas ha sido atribuida a una baja actividad biológica (87). Sin embargo, algunos autores la reportan normal (88,89) o incrementada (90), por otro lado la actividad biológica del complejo PRL-IgG también ha sido reportada como normal (91), baja o incrementada (92). La variabilidad en estos resultados han dependido del tipo de muestra probada (suero total o fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel), y del método usado para detectar la PRL inmunorreactiva (radioinmunoensayo o ensayo inmunoradiométrico).

En un estudio previo (77), demostramos que los pacientes con LES e hiperprolactinemia tienen una frecuencia elevada de macroprolactinemia (31.7%), formada por un complejo PRL-inmunoglobulina G (IgG) con un peso molecular de 150 kDa, siendo mayor en pacientes sin causa probada de hiperprolactinemia o clasificados con "hiperprolactinemia idiopática" que en aquellos con hiperprolactinemia secundaria (40.7% vs. 14.3%), en cambio, los que no tuvieron hiperprolactinemia ( $\leq 20$  ng/mL) en ninguno se les detectó autoanticuerpos anti-PRL. También se encontró una correlación positiva y significativa entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles de PRL sérica ( $r_s = 0.98$ ,  $p = 0.0001$ ). Todos estos datos sugieren que los autoanticuerpos anti-PRL están asociados al incremento de los niveles séricos de PRL y al estado hiperprolactinémico, sin embargo, no hay asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-PRL y la actividad de la enfermedad evaluada con SLEDAI.

Un estudio que analizó la presencia de isoformas circulantes de la PRL en pacientes con LES e hiperprolactinemia idiopática, mostró que los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL (con predominio en sangre de la forma molecular big big PRL [150 kDa]) tuvieron menor actividad clínica y serológica de la enfermedad que en los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL (con la presencia exclusiva en sangre de la forma molecular little PRL [23 kDa]) (93). Otros datos relevantes en este mismo estudio, fueron que todas eran mujeres y ninguna presentó datos clínicos de hiperprolactinemia (trastornos menstruales y/o galactorrea), e incluso en una de estas pacientes tuvo un embarazo que

llego a término sin que hubiera recibido tratamiento para reducir los niveles séricos de PRL. Todos estos datos sugieren que a pesar del estado hiperprolactinémico en los pacientes con LES con autoanticuerpos anti-PRL, la acción biológica de la PRL esta disminuida; además la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (macroprolactinemia) puede ser una explicación alterna para aquellos estudios clínicos en donde no se ha encontrado relación entre los niveles séricos de PRL y actividad lúpica, en donde tampoco se tomaron en cuenta la presencia de isoformas o variantes moleculares de la PRL, dado que hay suficientes evidencias que indican que la PRL tiene efectos importantes en la respuesta inmune.

### ***Justificación***

El LES es una enfermedad reumática autoinmune común, 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 (94).

Asimismo, es motivo relevante de atención médica y su curso clínico puede variar desde un trastorno con episodios leves hasta llegar a ser una enfermedad mortal.

De lo anterior se desprende 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 se justifica ahondar en el conocimiento y mecanismos involucrados de la PRL en la patogénesis de la enfermedad.

### ***Planteamiento del problema***

Se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos anti-PRL tanto en pacientes con hiperprolactinemia sin enfermedades autoinmunes, como en el LES, y que los títulos de autoanticuerpos anti-PRL correlacionan positivamente con los niveles séricos de PRL (77,86). Sin embargo, no se conoce si la presencia del anticuerpo anti-PRL por si mismo e independientemente de cómo fue inducido, es capaz de incrementar los niveles séricos de PRL.

La causa por la que se encuentran anticuerpos anti-PRL en el LES no es clara, se puede especular que la secreción de una PRL alterada o de su hipersecreción induzca la formación de autoanticuerpos anti-PRL por un mecanismo desconocido. Un mecanismo alternativo es la presencia de linfocitos B autorreactivos a la PRL con producción de autoanticuerpos anti-PRL provocando el estado hiperprolactinémico en LES.

La presencia de autoanticuerpos anti-PRL puede aumentar los niveles séricos de PRL por los siguientes mecanismos: 1) la PRL libre es fácilmente filtrada por el glomérulo, pero la PRL unida al anticuerpo y 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 (95,96) y 2) la PRL juega un papel de autorregulación en la hipófisis o hipotálamo (retroalimentación negativa), la PRL unida puede alterar estos mecanismos de autorregulación provocando hipersecreción de PRL, semejante a lo que sucede en el síndrome autoinmune a la insulina, en la cual grandes cantidades de insulina son unidos a los anticuerpos anti-insulina (97,98).

En resumen, al momento actual se sabe que los autoanticuerpos anti-PRL están asociados al estado hiperprolactinémico en pacientes con LES, pero no se conoce si la presencia de anticuerpos anti-PRL son capaces de inducir la elevación de los niveles séricos de PRL, siendo uno de los probables mecanismos para explicar este fenómeno un aclaramiento plasmático disminuido del complejo PRL-IgG.

Por otra parte, los pacientes con LES e hiperprolactinemia idiopática y con autoanticuerpos anti-PRL muestran menor actividad clínica y serológica de la enfermedad

que los pacientes con LES e hiperprolactinemia idiopática pero sin autoanticuerpos anti-PRL, y tampoco presentan las manifestaciones clínicas típicas del estado hiperprolactinémico (amenorrea y/o galactorrea).

El propósito de esta investigación fue elucidar el mecanismo involucrado en la menor actividad lúpica en un subgrupo de pacientes con LES con autoanticuerpos anti-PRL a pesar de tener hiperprolactinemia, determinando si el complejo PRL-IgG tiene actividad biológica *in vitro* en células Nb2, el método más ampliamente usado para evaluar la actividad biológica de hormonas lactogénicas como la PRL (99). Así como, comparar el aclaramiento plasmático entre el complejo PRL-IgG y la PRL libre o monomérica como uno de los mecanismos para explicar la hiperprolactinemia por la presencia de autoanticuerpos anti-PRL.

En base a lo anterior, el estudio se dirigió a contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es el efecto biológico *in vitro* en células Nb2 del complejo PRL-IgG de pacientes con LES ?
2. ¿Cuál es el aclaramiento plasmático en ratas sanas del complejo PRL-IgG de pacientes con LES ?

## ***Objetivos***

### ***Objetivo general***

Determinar la actividad biológica *in vitro* y el aclaramiento plasmático del complejo PRL-IgG obtenido de pacientes con LES.

### ***Objetivos específicos***

1. Determinar si hay diferencia en la actividad biológica *in vitro* en células Nb2 entre el complejo PRL-IgG obtenido de pacientes con LES y de la forma libre o monomérica de la PRL.
2. Determinar si hay diferencias en el aclaramiento plasmático en ratas sanas del complejo PRL-IgG obtenido de pacientes con LES y de la forma libre o monomérica de la PRL.

## ***Sujetos, Material y Métodos***

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité local de Investigación Médica y el Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social. El consentimiento escrito fue obtenido de todos los pacientes quienes voluntariamente aceptaron participar en el estudio. Los animales fueron manejados de acuerdo a la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publicada en los Estados Unidos de América por el Institute of Laboratory Animal Resources, patrocinado por el National Research Council de los EEUU y de la National Academy of Science.

### ***Pacientes y controles***

Se estudiaron 27 pacientes del sexo femenino con diagnóstico de LES, todas las pacientes cumplieron con por lo menos cuatro de los criterios revisados de la Asociación Americana de Reumatología (100) (Anexo 1). La edad media fue de  $31.9 \pm 9.5$  años (amplitud 16 – 48), el tiempo medio de evolución de la enfermedad fue de  $81.9 \pm 73.2$  meses (amplitud 2 – 233, mediana 66). Todas las pacientes tenían hiperprolactinemia ( $> 20$  ng/mL) al momento del estudio medido por IRMA, la concentración sérica media de PRL fue de  $51.4 \pm 20.8$  ng/mL (amplitud 22.7 – 101.7). Ninguna de las pacientes tomaba una dosis mayor de 10 mg al día de prednisona y tampoco estaban bajo tratamiento con algún inmunosupresor en las últimas 9 semanas previas al estudio. La actividad de la enfermedad fue evaluada por el índice de actividad de la enfermedad en lupus eritematoso sistémico (SLEDAI) (Anexo 2) (101). Como controles, fueron usadas las muestras séricas de cinco mujeres normales y de siete mujeres con prolactinoma con edades entre 25 a 36 años.

### ***Pruebas hormonales***

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en condiciones basales entre las 09:00 y 11:00 horas, el suero fue separado, alicuotado y almacenado a  $-35$  C hasta su utilización que no fue mayor a 2 meses. La PRL sérica, en las fracciones de cromatografía de

filtración en gel, de cromatografía de afinidad y para los estudios de aclaramiento plasmático en ratas fue medida por duplicado por IRMA (RIA-gnost Prolactin. CIS bio international, France). Esta prueba tiene una sensibilidad de 0.09 ng/mL, los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores del 6%. La presencia de autoanticuerpos anti-PRL no interfieren con esta prueba (77), presenta especificidad para la PRL humana (hPRL), ya que no tiene reacción cruzada con la PRL de rata (rPRL). Las muestras séricas también fueron medidas por RIA en fase líquida usando dos anticuerpos: antisuero policlonal de conejo anti-hPRL y antisuero de cabra anti-gammaglobulina de conejo (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles), esta prueba tiene una sensibilidad de 1.4 ng/mL, los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores del 8%.

### ***Cromatografía de filtración en gel***

La cromatografía de filtración en gel, es un método de separación de sustancias de acuerdo a su tamaño molecular. Consta de una fase estacionaria (medio cromatográfico) constituida por partículas pequeñas de un gel (macromoléculas que tienen enlaces cruzados dando origen a un armazón tridimensional), insoluble y sin carga, empacada en una columna y una fase líquida que ocupa el espacio entre las partículas y se hace fluir a través del medio cromatográfico. Las sustancias que se van a separar son acarreadas por el flujo del líquido y la fase estacionaria retarda su progreso. Sustancias diferentes son retardadas por el medio en diferente grado, y por lo tanto, migran a diferentes velocidades. Si se mezclan dos sustancias y se aplican en el extremo superior del medio, lo abandonarán separadas una de otra, la primera que se mueve en el medio más rápido, seguida por la que se mueve más lentamente. El efecto de retardo es producido por la partición de las sustancias entre el líquido y la fase estacionaria. Cuando una molécula se encuentra en la fase de gel, no se mueve en la dirección del líquido, ya que el flujo tiene lugar entre las esferas del gel y no hay un flujo considerable a través de las partículas del gel. La velocidad a la que pasa un soluto a través del medio cromatográfico, es proporcional al tiempo medio entre las partículas del gel. Este tiempo promedio, esta determinado por el coeficiente de partición de las sustancias entre las fases del gel y la

fase líquida, ya que el promedio para una molécula dada en un periodo de tiempo es igual al promedio para un gran número de moléculas en un instante dado.

De acuerdo a lo anterior, la cromatografía de filtración en gel se fundamenta en que las moléculas son transportadas hacia el lecho cromatográfico debido al flujo del líquido entre las partículas del gel. Las moléculas grandes por razones estéricas, no están en posibilidad de entrar en las esferas del gel y viajan a la misma velocidad que el líquido, o bien, las moléculas grandes no pueden aproximarse a las ligaduras cruzadas, mientras que las pequeñas pueden penetrar en el gel y tienen acceso a todos los espacios entre las cadenas de la matriz del gel, y por lo tanto, están distribuidas igualmente entre el líquido libre y el líquido en el gel. Las moléculas en el interior de las esferas del gel están estacionarias. La velocidad promedio en la dirección del flujo es proporcional al tiempo que las moléculas tardan para pasar entre las partículas del gel. Las moléculas pequeñas viajarán, en consecuencia, a menor velocidad y salen retardadas del medio cromatográfico, en cambio, las moléculas grandes tienen menos espacio dentro del gel y el coeficiente de partición se desplaza a favor del líquido que se encuentra fuera de las partículas del gel. Esto induce a que las moléculas grandes salgan del medio cromatográfico antes que las moléculas pequeñas, el volumen de elución esta determinado por el peso molecular.

Para este procedimiento, se utilizó una columna de vidrio de 60 x 1.5 cm, la cual se empacó con dextrana (Sephadex G-200, Pharmacia Fine Chemicals) previamente hidratada y lavada con la solución eluyente PBS (pH 7.4) conteniendo 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 de cromatografía, se recolectaron 75 fracciones de 1.3 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), ovoalbúmina (45 kDa) y citocromo C (12.4 kDa). Después se cromatografió en las mismas condiciones  $^{125}\text{I}$ -IgG (150 kDa),  $^{125}\text{I}$ -hPRL (23 kDa) y  $^{125}\text{I}$  (volumen total), midiendo después las cuentas por minuto (cpm) en un contador gamma en cada una de las fracciones eluidas.

**Cromatografía de los sueros.** Se utilizó 2 mL de suero, la muestra se agregó a la columna lentamente e inmediatamente se inició a colectar las fracciones. Las fracciones fueron congeladas y guardadas a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación en el mismo día de PRL por IRMA y por bioensayo en células Nb2, este tiempo no fue mayor a dos semanas.

**Coeficiente de partición ( $K_{av}$ ).** Este parámetro se utilizó para caracterizar el comportamiento cromatográfico de las isoformas de la PRL, para calcularlo se empleó la fórmula siguiente:

$$K_{av} = V_e - V_o / V_x = V_e - V_o / V_t - V_o$$

$V_e$  = Volumen de elución, que es el volumen del líquido que ha pasado a través de la columna entre la aplicación de la muestra y la elución de la concentración máxima de la sustancia.

$V_o$  = Volumen vacío del lecho cromatográfico, que es el volumen del líquido del espacio intersticial entre las partículas del gel y se puede determinar mediante la cromatografía de alguna sustancia que no sea retardada por el gel (que sea totalmente excluida, como el azul dextran) y medición de su volumen de elución.

$V_x$  = Volumen del gel en el lecho cromatográfico, y se obtiene por diferencia entre el volumen total ( $V_t$ ) del lecho y el volumen vacío.

$V_t$  = Volumen total, se puede calcular a partir de la longitud y diámetro del lecho mediante la fórmula para la determinación del volumen de un cilindro.

En la cromatografía de filtración en gel se puede relacionar el comportamiento cromatográfico con el peso molecular, por lo que el coeficiente de partición calculado para cada marcador de peso molecular se graficó como función del peso molecular en una

escala logarítmica. A partir de esta gráfica (figura 1), y después de obtener los perfiles cromatográficos de la PRL inmunorreactiva de los sueros, se obtuvo el peso molecular y la proporción de las especies o isoformas de la PRL.

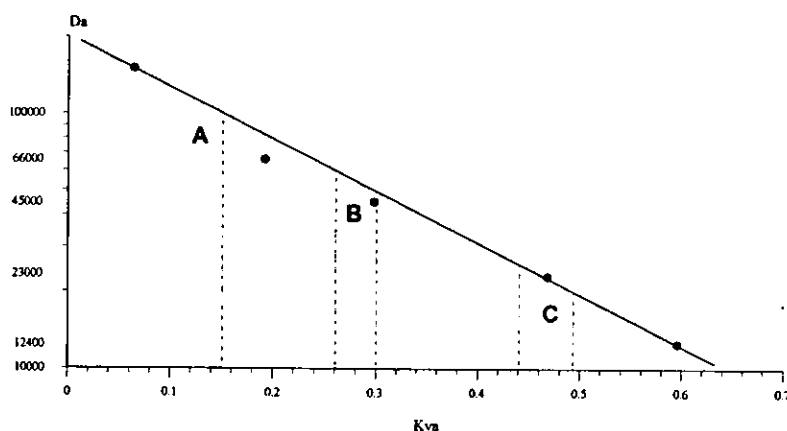


Figura 1. Relación entre el peso molecular (Da) y el coeficiente de partición ( $K_{av}$ ) por cromatografía de filtración en gel (columna de 1.5 x 56 cm de Sephadex G-200). A. big big PRL (>100 kDa), B. big PRL (50-60 kDa), y C. little PRL (20-26 kDa).

### Cromatografía de afinidad

El fundamento de la cromatografía de afinidad consiste en que para que una sustancia pueda ser separada y purificada de una mezcla, se disponga de un ligando bio-específico que pueda ser pegado covalentemente a una matriz cromatográfica como la sefarosa CL-4B (gel de esferas de agarosa). También se requiere que el ligando inmovilizado retenga su afinidad de unión específica por la sustancia de interés y que haya métodos que permitan la desabsorción selectiva de la sustancia unida (en su forma activa), después de eliminar el material no unido. Por lo tanto, el ligando debe tener una afinidad de unión específica y reversible por las sustancias que van a purificarse. También debe tener grupos químicamente modificables que le permitan unirse a la matriz sin destruir su actividad de unión. Uno de los ligandos utilizados para la purificación de inmunoglobulinas es la proteína G, derivada de la pared del *Streptococcus sp.* del Grupo C. La forma recombinante tipo 2 expresada en *E coli*, une a la región Fc de muchos tipos de IgG y se

usa para detectar, cuantificar y purificar los anticuerpos IgG y complejos antígeno-anticuerpo. Contiene dos dominios B de unión a IgG y se une a todas las subclases de IgG humana; no se une a la IgM, IgE, IgA, IgD, albúmina y carece de sitios de unión para Fab. La proteína G se une a los anticuerpos a un intervalo de pH de 4.0 a 8.0, con un pH óptimo de aproximadamente 5.0. Los anticuerpos unidos pueden ser eluidos en un intervalo de pH de 2.5-3.0.

Una columna de afinidad para IgG fue usada para confirmar que el componente que une a la PRL sérica es una IgG. Se utilizó una columna de 1 mL de proteína G acoplada a sefarosa (HiTrap G, Pharmacia LKB, Uppsala Sweden), se instaló 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 aplicó a la columna 500 µl de suero diluido con 500 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo 0.1% de albúmina bovina y de inmediato se colectaron fracciones de 1.5 mL por minuto. Las primeras 10 fracciones se eluyeron con el mismo buffer y las últimas 10 fracciones fueron eluidas con 0.1 M glicina-HCl (pH 3.0), a los tubos donde se colectaron éstas fracciones ácidas, previamente se les agregó 120 µl de 1 M Tris-HCl (pH 9.0) para neutralizar. En cada una de las fracciones colectadas se les determinó la concentración de PRL por IRMA. Las columnas fueron regeneradas con PBS, dejando pasar 4-5 volúmenes de la columna, la misma columna se empleó para procesar no más de 10 muestras.

Cuando los estándares comerciales de PRL fueron aplicados a la columna, la PRL no fue retenida por la columna de proteína G (media  $\pm$  DE:  $1.9 \pm 3.5\%$ ).

#### *Células de linfoma Nb2 dependientes de PRL (bioensayo)*

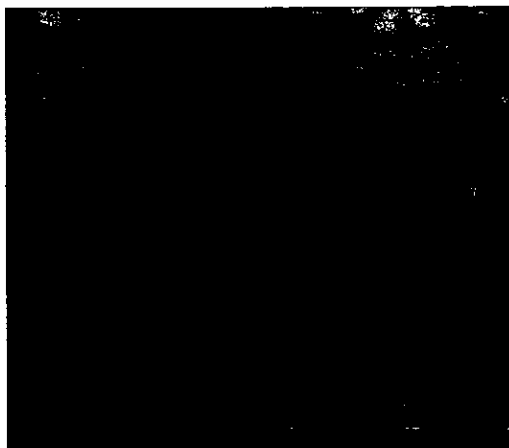
El fundamento del bioensayo se basa en la evaluación de la proliferación de células Nb2 (figura 2), estas son células derivadas de linfoma (células T) de rata macho estrogenizado y tienen la particularidad de proliferar en presencia de PRL, hormona del crecimiento (GH) y lactógeno placentario (LP). La bioactividad de la PRL en suero como en fracciones obtenidas por filtración en gel fueron medidas usando el bioensayo en células

de linfoma Nb2 como ha sido descrito por Tanaka y colaboradores (99) con mínimas modificaciones.

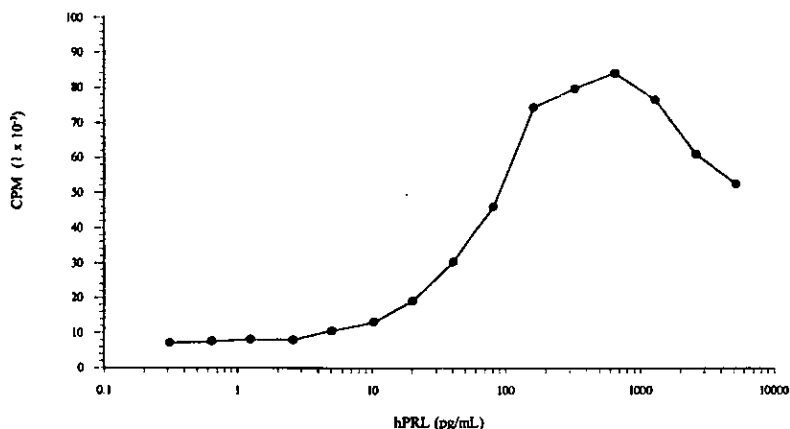
Las células fueron mantenidas a 37 C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de Fischer (SIGMA, Chemical CO) complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) como fuente de lactogeno (GIBCO, GBRL), 10% de suero de caballo (GIBCO, GBRL), 10<sup>-4</sup> mol/L de 2 B-mercaptoethanol (SIGMA, Chemical CO), 2 mM de L-glutamina (SIGMA, Chemical CO), 50 IU/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin (GIBCO, GBRL) ("medio de mantenimiento"), en este medio las células duplican su número entre 18 a 24 horas. Las resiembras de las células se realizaron cada tercer día, dejándolas a una concentración de 2 x 10<sup>5</sup> células/mL en "medio de mantenimiento" hasta que alcanzaban la confluencia celular (1.2-1.6 x 10<sup>6</sup> células/mL).

Antes del bioensayo, las células fueron detenidas en la fase temprana del ciclo celular (G<sub>1</sub>) por pre-incubación (18-24 h) en medio libre de lactogeno ("medio estacionario", igual al "medio de mantenimiento", excepto que sólo contenía FBS al 1%). Las células en confluencia fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 min y se resuspendieron en "medio estacionario" a una concentración de 5-6 x 10<sup>5</sup> células/mL. El día del bioensayo, las células del medio estacionario fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 min y resuspendidas en "medio de bioensayo" (igual al "medio de mantenimiento", pero sin FBS) a una concentración de 2-2.5 x 10<sup>5</sup> células/mL y se pusieron 100 µl de la suspensión en placas de fondo plano de 96 pozos. A este tiempo, el reinicio del ciclo celular fue estimulado por la adición de dosis crecientes de PRL humana (hPRL) hipofisiaria altamente purificada (NIDDK-hPRL-SIAFPB-3, AFP3855A, amablemente donada por el Dr. Parlow, Director Científico del National Hormone & Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center). La bioactividad de la PRL en suero, como de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel fueron probadas a diferentes diluciones en "medio de bioensayo" (volumen total de 50 µl) para obtener un paralelismo con la curva estándar (hPRL). Para inhibir el efecto lactogénico de la hormona humana del crecimiento (hGH), el antisuero policlonal de conejo anti-hGH (NIDDK-anti-hGH-IC-3 A.S., CYTO, AFPC11981A, amablemente donado por el Dr. Parlow, Director Científico del National Hormone & Pituitary Program, Harbor-UCLA

Medical Center) fue añadido a los pozos, a una dilución final de 1:4,000. Los cultivos por triplicado fueron posteriormente mantenidos en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 C por 72 h. El efecto de la hPRL, suero y de las fracciones obtenidas por filtración en gel sobre la proliferación celular (síntesis de DNA) fueron analizadas por la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina (1 µCi/pozo: Amersham International, Buckinghamshire, England) seis horas previas a la cosecha de las células Nb2. La viabilidad celular siempre fue mayor al 95% por exclusión de azul de tripán (0.4% en PBS) (SIGMA, Chemical CO) y la sensibilidad de esta prueba para la PRL fue de 0.3 pg/mL (figura 3).



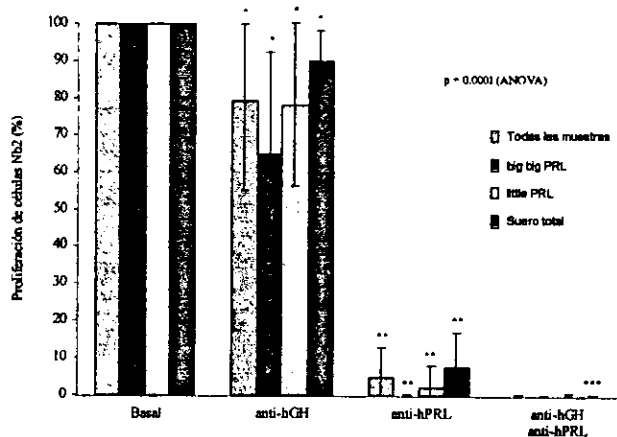
**Figura 2.** Células de linfoma de rata (Nb2). Microscopía invertida 40 X



**Figura 3.** Curva dosis respuesta de las células Nb2 por PRL humana. Las células fueron incubadas en presencia de concentraciones incrementadas de PRL humana hipofisiaria y el crecimiento celular fue determinado a los 3 días por incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Los datos representan la media de las mediciones hechas por triplicado.

Para descartar la presencia de otro factor sérico que promoviera el crecimiento sobre las células Nb2, a otras series de cultivo por triplicado se les agregó un anticuerpo policlonal de conejo anti-hPRL (NIDDK-anti-hPRL-IC-5 CYTO, AFP-55781789, amablemente donado por el Dr. Parlow, Director Científico del National Hormone & Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center) a una dilución final de 1:4,000, en adición o no de anticuerpo policlonal anti-hGH a una dilución final de 1:4,000. Las cpm alcanzadas por las muestras probadas sin la adición de anticuerpos específicos (anti-hPRL o anti-hGH) fue considerado como el 100% de la proliferación de las células Nb2. La figura 4, muestra el efecto sobre la proliferación de las células Nb2 por la adición del suero o las fracciones que contenían big big PRL o little PRL, la cual fue parcialmente inhibida en forma significativa por presencia del anticuerpo anti-hGH (media  $\pm$  DE: suero  $90.0 \pm 8.2\%$ , big big PRL  $64.7 \pm 27.7\%$  y little PRL  $78.2 \pm 22.2\%$  [ $p \leq 0.002$ ]) y completamente abolida en presencia únicamente del anticuerpo anti-hPRL (media  $\pm$  DE: suero  $7.5 \pm 9.3\%$ , big big PRL  $0.13 \pm 0.09\%$  y little PRL  $2.0 \pm 5.9\%$  [ $p = 0.0001$ ]) o en presencia combinada de anticuerpos anti-PRL y anti-hGH (media  $\pm$  DE: suero  $0.13 \pm 0.31\%$ , big big PRL  $0.0\%$  y little PRL  $0.14 \pm 0.43$  [ $p = 0.0001$ ]). La inhibición de la

proliferación en células Nb2 por el anticuerpo anti-hPRL en las fracciones de filtración en gel que contenían big big PRL y little PRL no mostró diferencia cuando se agregó anticuerpo anti-hGH (media  $\pm$  DE: big big PRL  $0.13 \pm 0.09\%$  vs.  $0\%$  y little PRL  $2.0 \pm 5.9\%$  vs.  $0.14 \pm 0.43\%$  [ $p \geq 0.987$ ]), en cambio, si mostró diferencia significativa cuando la muestra probada fue el suero total (media  $\pm$  DE:  $7.5 \pm 9.3\%$  vs.  $0.13 \pm 0.31\%$ ,  $p = 0.004$ ). Lo anterior demuestra que en las fracciones de filtración en gel la concentración de la hGH era muy baja debido a la dilución de esta hormona durante el proceso de cromatografía, en cambio, en el suero total la concentración de la hGH fue más elevada que en las fracciones de filtración en gel y suficiente para promover la proliferación de las células Nb2. La adición combinada de anti-hPRL y anti-hGH inhibió completamente ( $> 99\%$ ) la proliferación de células Nb2 en todas las muestras probadas.



**Figura 4.** Efecto de los autoanticuerpos anti-hormona del crecimiento (GH) y anti-prolactina (PRL) sobre la proliferación de células Nb2 por diferentes muestras con PRL. Las células fueron incubadas en ausencia de anticuerpos específicos (basal), con anticuerpos anti-GH, anti-PRL y con ambos anticuerpos. La dilución final de cada anticuerpo en los cultivos celulares fue de 1:4,000. El crecimiento celular fue determinado a los tres días por incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Las mediciones representan la media  $\pm$  DE por triplicado de cada muestra.

Prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey: \*  $p \leq 0.002$  vs. basal; \*\*  $p = 0.0001$  vs. anti-GH; \*\*\*  $p = 0.004$  vs. anti-PRL.

La determinación de PRL, tanto por IRMA, como por bioensayo en las cromatografías de filtración en gel se hicieron el mismo día y los datos fueron expresados de acuerdo al

cálculo de la relación Nb2/IRMA. La relación Nb2/IRMA en las fracciones de filtración en gel que contenían big big PRL o little PRL fue hecha en pooles de 2 a 3 picos de estas fracciones.

### *Western blotting*

El procedimiento usado fue similar al reportado por Sinha y colaboradores (102). La PRL del suero o fracciones de cromatografía de filtración en gel fueron inmunoprecipitadas mediante la incubación de las muestras (400 - 800  $\mu$ l), más 100 - 200  $\mu$ l de PBS (pH 7.4) conteniendo 0.1% de azida de sodio y antisuero anti-hPRL (el mismo anticuerpo utilizado en el bioensayo) a una dilución final de 1:1,000 por 72 horas a 4 C con agitación continua, al cabo de este tiempo, se agregó 5 - 10  $\mu$ l de antisuero de cabra anti-gammaglobulina de conejo (Dako) y se dejaron por 24 horas más a 4 C con agitación continua. Se les agregó 500  $\mu$ l de agua bidestilada fría y se dejaron 30 min a 4 C y fueron centrifugadas a 3000 rpm por 30 min a 4 C. El sedimento se lavó una vez con 1 mL de agua bidestilada y se centrifugó de la misma forma y los tubos se secaron a 50 C. Los precipitados fueron resuspendidos y disueltos en 30  $\mu$ l de buffer de muestra de Laemmli y calentados a 95 C por 5 min. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras (103) a 150 volts. El suero de conejo normal fue usado como control.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa con buffer conteniendo 20% metanol sin SDS (104) por 90 min a 100 volts. Las membranas fueron bloqueadas con PBS (pH 7.4), Tween-20 al 0.1% y leche en polvo descremada al 5% (Sveltes) por una hora a 37 C, e incubadas por 4 horas a temperatura ambiente y agitación continua con el mismo antisuero de conejo anti-hPRL a una dilución final de 1:1,000 en PBS (pH 7.4), Tween-20 al 0.1% y leche en polvo descremada al 5%. Las membranas fueron lavadas por periodos de tres minutos en agitación por cinco veces con PBS (pH 7.4) y Tween-20 al 0.1%. Luego las membranas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente y agitación continua con antisuero de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugada a peroxidasa (DAKO) a una dilución final de 1:2,000 en PBS (pH 7.4), Tween-20 al 0.1% y leche en polvo descremada al 5%.

Después, las membranas se lavaron por periodos de tres minutos en agitación continua por cinco veces con PBS (pH 7.4) y Tween-20 al 0.1%. Finalmente, la solución para desarrollar color (diaminobenzidina [SIGMA, Chemical CO] 10 mg en 20 mL de PBS (pH 7.4) y 20  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 3.0%) fue agregada para localizar los inmunocomplejos.

### ***Estudios de aclaramiento plasmático de la PRL***

Para estudiar el aclaramiento plasmático de la hPRL se utilizaron 14 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (250 – 300 g) de 8 semanas de edad. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina y droperidol por vía intramuscular y se les administró heparina por vía intraperitoneal. Se les cateterizó la vena femoral y en forma aleatoria se les administró 1 mL de suero de los pacientes con LES (con o sin autoanticuerpos anti-PRL ) rápidamente. Se les tomó muestra de sangre (200  $\mu$ L) a los minutos 1, 5, 10, 20, 40, 60 y 90 después de la inyección y el plasma de la rata fue separado y congelado a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de la hPRL por IRMA, la rPRL no mostró interferir con la determinación de hPRL por IRMA.

El suero de los pacientes con LES fue diluido con solución salina isotónica para dar la misma concentración de PRL (ng/mL) entre cada par de sueros de acuerdo a la presencia o ausencia de autoanticuerpos anti-PRL, es decir 7 sueros con autoanticuerpos anti-PRL pareados por la concentraciones de PRL con 7 sueros sin autoanticuerpos anti-PRL. La concentración de PRL al primer minuto se consideró como el 100% de la PRL circulante.

### ***Análisis estadístico***

El análisis de los datos consistió de las siguientes etapas:

***Análisis inicial.*** En el cual 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 todas las mediciones hechas se realizaron por medio de el coeficiente de variación.

***Análisis de las variables estudiadas.*** Para comparar las variables clínicas y demográficas de los pacientes y controles se empleó para aquellas variables con distribución normal la prueba de ANOVA de una vía y para conocer qué grupos diferían se uso la prueba de Scheffé y en aquellas sin distribución normal la prueba de Kruskal-Wallis y para saber qué grupos diferían se empleó la prueba de U de Mann-Whitney. La comparación del porcentaje de las diferentes isoformas de la PRL, como del porcentaje de PRL retenida por la columna de proteína G se empleó la prueba paramétrica de ANOVA de una vía y para conocer qué grupos diferían se uso la prueba a posteriori de Scheffé. Para comparar la actividad biológica del complejo PRL-IgG y de la forma libre o monomérica de la PRL en las diferentes muestras biológicas con hPRL sobre las células Nb2 se empleó ANOVA de una vía y para conocer qué grupos diferían se uso la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey. Finalmente, para comparar el aclaramiento plasmático del complejo PRL-IgG y de la forma libre o monomérica de la PRL se empleó la prueba t de Student para muestras dependientes.

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

**Hipótesis nulas:**

1. No hay diferencia en la actividad biológica del complejo PRL-IgG y de la PRL en su forma libre o monomérica.
2. No hay diferencia en el aclaramiento plasmático en ratas sanas del complejo PRL-IgG de la PRL en su forma libre o monomérica.

## **Resultados**

### **Descripción general**

Los pacientes para su análisis fueron divididos en tres grupos de acuerdo a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL y la actividad de la enfermedad evaluada por SLEDAI: Grupo I. Ocho pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, a estas pacientes, previamente se les había hecho el diagnóstico de hiperprolactinemia con la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (77,93), todas las pacientes tuvieron hiperprolactinemia sostenida durante un periodo de seguimiento de por lo menos 13 meses y ninguna con causas asociadas a la elevación de la PRL sérica. El puntaje medio por SLEDAI fue de  $1.1 \pm 2.8$  (amplitud 0 – 8, mediana 1). Grupo II. Doce pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL y puntaje medio por SLEDAI de  $1.3 \pm 1.6$  (amplitud 0 – 4, mediana 1) debido a hipocomplementemia y/o anti-dsDNA positivos, estas pacientes fueron considerados sin actividad lúpica. Grupo III. Siete pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL y puntaje medio por SLEDAI de  $17.7 \pm 10.1$  (amplitud 7 – 37, mediana 18), estas pacientes fueron consideradas con actividad lúpica. Los sueros controles constituyeron el grupo IV. Cinco mujeres normales con niveles de PRL < 20 ng/mL, y el Grupo V. Siete mujeres con hiperprolactinemia secundaria a tumor hipofisiario productor de PRL (macroprolactinoma).

Los datos clínicos de las pacientes con LES se muestran en la tabla 1. La edad media sólo mostró diferencia significativa entre el grupo II y III ( $37.4 \pm 8.7$  años vs.  $23.9 \pm 6.1$ ,  $p = 0.005$ ), la duración de la enfermedad fue significativamente mayor en el grupo I y II, que en el grupo III (mediana: 64.5 y 119 meses vs. 9, respectivamente,  $p \leq 0.005$ ), en cambio, el puntaje de SLEDAI fue significativamente menor en el grupo I y II, que en el grupo III (mediana: 0 y 1 puntos vs. 18, respectivamente,  $p = 0.0001$ ). Por otro lado, la mediana del puntaje de SLEDAI en las mujeres con autoanticuerpos anti-PRL (mediana 0, amplitud 0-8) fue significativamente menor que en las mujeres sin autoanticuerpos anti-PRL (mediana 2, rango 0-37;  $p = 0.039$ ).

Los trastornos menstruales fueron más frecuentes en los grupos II y III, que en el grupo I (30.0% y 57.1% vs. 0.0%, respectivamente,  $p = 0.02$ ), así mismo, la frecuencia de causas conocidas que elevan los niveles séricos de PRL fue más alta en los grupos II y III, que en el grupo I (41.7% y 71.4% vs. 0.0%, respectivamente,  $p = 0.015$ ).

**Tabla 1.** Datos clínicos en 27 pacientes con lupus eritematoso sistémico e hiperprolactinemia.

| Caso      | Edad (años) | Duración de la enfermedad ad (meses) | SLEDAI          | Manifestaciones                 | Menstruaciones            | Paridad        | Causas de elevación de los niveles séricos de PRL |
|-----------|-------------|--------------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------|----------------|---------------------------------------------------|
| Grupo I   | 30.8 ± 8.2  | 64.5 <sup>a</sup>                    | 0 <sup>c</sup>  |                                 | 0/8 (0.0%) <sup>d</sup>   | 1 <sup>e</sup> | 0/8 (0.0%) <sup>f</sup>                           |
| 1         | 20          | 132                                  | 1               | anti-dsDNA                      | Normales                  | 1              | No                                                |
| 2         | 29          | 66                                   | 0               |                                 | Normales                  | 1              | No                                                |
| 3         | 37          | 52                                   | 0               |                                 | Normales                  | 3              | No                                                |
| 4         | 29          | 48                                   | 0               |                                 | Normales                  | 0              | No                                                |
| 5         | 19          | 63                                   | 0               |                                 | Normales                  | 1              | No                                                |
| 6         | 37          | 74                                   | 0               |                                 | Normales                  | 1              | No                                                |
| 7         | 33          | 24                                   | 8               | anti-dsDNA, H, A                | Normales                  | 4              | No                                                |
| 8         | 42          | 159                                  | 0               |                                 | Normales                  | 3              | No                                                |
| Grupo II  | 37.4 ± 8.7  | 119 <sup>b</sup>                     | 1 <sup>c</sup>  |                                 | 3/10 (30.0%) <sup>d</sup> | 1 <sup>e</sup> | 5/12 (41.7%) <sup>f</sup>                         |
| 1         | 35          | 233                                  | 4               | anti-dsDNA, H                   | Normales                  | 0              | No                                                |
| 2         | 36          | 19                                   | 0               |                                 | Normales                  | 0              | No                                                |
| 3         | 47          | 221                                  | 0               |                                 | Histerectomía             | 0              | No                                                |
| 4         | 48          | 221                                  | 2               | anti-dsDNA                      | Normales                  | 4              | Metoclopramida                                    |
| 5         | 37          | 7                                    | 0               |                                 | Histerectomía             | 1              | Domperidona                                       |
| 6         | 43          | 134                                  | 2               | H                               | Normales                  | 3              | No                                                |
| 7         | 36          | 153                                  | 0               |                                 | Normales                  | 2              | No                                                |
| 8         | 47          | 173                                  | 0               |                                 | Irregulares               | 3              | Perfenacina                                       |
| 9         | 37          | 12                                   | 0               |                                 | Normales                  | 1              | Amitriptilina                                     |
| 10        | 25          | 102                                  | 2               | H                               | Irregulares               | 0              | No                                                |
| 11        | 19          | 104                                  | 4               | anti-dsDNA, H                   | Normales                  | 0              | No                                                |
| 12        | 39          | 85                                   | 2               | H                               | Irregulares               | 2              | Dep. Cr. 38 ml/min.                               |
| Grupo III | 23.9 ± 6.1  | 9 <sup>b</sup>                       | 18 <sup>c</sup> |                                 | 4/7 (57.1%) <sup>d</sup>  | 0 <sup>e</sup> | 5/7 (71.4%) <sup>f</sup>                          |
| 1         | 20          | 9                                    | 22              | anti-dsDNA, H, A, R             | Irregulares               | 0              | Dep. Cr. 41 ml/min                                |
| 2         | 27          | 8                                    | 18              | H, A, R                         | Normales                  | 0              | Dep. Cr 43 ml/min                                 |
| 3         | 33          | 10                                   | 8               | anti-dsDNA, H, A                | Amenorrea                 | 0              | Metoclopramida                                    |
| 4         | 28          | 20                                   | 14              | anti-dsDNA, H, MC, A, S         | Irregulares               | 0              | No                                                |
| 5         | 25          | 72                                   | 37              | anti-dsDNA, H, N, A, R, S, HEMA | Normales                  | 3              | Haloperidol, Dep. Cr. 28 ml/min                   |
| 6         | 18          | 2                                    | 18              | anti-dsDNA, H, R, S, HEMA       | Irregulares               | 0              | Dep. Cr 47 ml/min                                 |
| 7         | 16          | 8                                    | 16              | anti-dsDNA, H, MC, HEMA         | Normales                  | 0              | No                                                |

<sup>a</sup> Media ± DE (ANOVA  $p = 0.005$ , Scheffé  $p = 0.006$  grupo II vs. III). <sup>b</sup> Mediana (Kruskal-Wallis  $p = 0.007$ , U Mann-Whitney  $p \leq 0.005$  grupo III vs. I y II).

<sup>c</sup> Mediana (Kruskal-Wallis  $p = 0.0001$ , U Mann-Whitney  $p \leq 0.005$  grupo III vs. I y II). <sup>d</sup> Porcentaje de trastornos menstruales ( $\chi^2$  de tendencia lineal de Mantel-Haenszel  $p = 0.02$ ,  $\chi^2 p = 0.03$  grupo I vs. III). <sup>e</sup> Mediana (Kruskal-Wallis  $p = 0.07$ ). <sup>f</sup> Porcentaje de causas asociadas a hiperprolactinemia ( $\chi^2$  de tendencia lineal de Mantel-Haenszel  $p = 0.015$ ,  $\chi^2 p \leq 0.05$  grupo I vs. II y III).

H = Hipocomplementemia. A = Articular. R = Renal. MC = Mucocutáneo. N = Neurológico. S = Serositis. HEMA = Hematológico. Dep. Cr. = Depuración de creatinina.

### ***Cromatografía de filtración en gel***

La distribución de las isoformas de la PRL sérica por cromatografía de filtración en gel de las 27 pacientes con LES se muestra en la tabla 2 y 3. En las pacientes con autoanticuerpos anti-PRL (grupo I), la mayor parte de la PRL inmunorreactiva ( $83.8 \pm 6.4\%$ ) fue eluida como big big PRL o macroprolactina, con un peso molecular estimado de 150 kDa, en cambio, en los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL (grupos II y III), la PRL eluida como big big PRL fue significativamente menor ( $1.5 \pm 1.8\%$  y  $0.07 \pm 0.2\%$ , respectivamente [ $p = 0.0001$ ]). En contraste, en los pacientes del grupo II y III casi toda la PRL inmunorreactiva ( $92.5 \pm 4.1\%$  y  $95.1 \pm 5.2\%$ , respectivamente) fue eluida en la misma posición de la PRL humana usada como estándar (little PRL, 23 kDa), en cambio en los pacientes del grupo I, la PRL eluida como little PRL fue significativamente menor ( $9.5 \pm 3.4\%$ ,  $p = 0.0001$ ). No hubo diferencias en la proporción de la PRL inmunorreactiva eluida como big PRL (50 – 60 kDa) entre los tres grupos ( $7.2 \pm 3.9\%$ ,  $6.0 \pm 2.9\%$  y  $4.9 \pm 5.1\%$ , respectivamente [ $p = 0.821$ ]). La figura 5, muestra los perfiles por filtración en gel de la PRL sérica en un pool de sueros de pacientes con autoanticuerpos anti-PRL y en un pool de sueros sin autoanticuerpos anti-PRL, los perfiles de filtración en gel de cada suero tratado de forma individual fueron semejantes a los vistos en estos pooles de sueros.

### ***Cromatografía de afinidad***

Cuando la IgG fue purificada de los sueros usando la columna de proteína G acoplada a Sepharose CL-4B, un porcentaje alto de la PRL inmunorreactiva ( $45.2 \pm 10.6\%$ ) fue co-eluida con la IgG de las pacientes del grupo I, en contraste, el porcentaje de PRL eluida en las fracciones que contenían IgG fue significativamente menor en las pacientes del grupo II y III ( $2.1 \pm 1.0\%$  y  $0.6 \pm 0.5\%$ , respectivamente [ $p = 0.0001$ ]), este porcentaje de PRL retenida fue similar cuando los estándares comerciales fueron pasados por la columna ( $1.9 \pm 3.5\%$ ). La figura 6, muestra los perfiles por cromatografía de afinidad de la PRL sérica en un pool de sueros de pacientes con autoanticuerpos anti-PRL y en un pool de sueros sin autoanticuerpos anti-PRL. Los perfiles por cromatografía de afinidad

de cada suero tratado de forma individual fueron semejantes a los vistos en estos pools de sueros.

**Tabla 2.** Niveles séricos de PRL medidos con IRMA, RIA y por bioensayo en células Nb2 y distribución de la PRL sérica inmunorreactiva por IRMA en tres fracciones después de la cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad en proteína G.

| Caso      | PRL $\mu\text{g/mL}$ |        |        | Cromatografía (%) <sup>a</sup> |         |            | Proteína G (%) <sup>b</sup> |
|-----------|----------------------|--------|--------|--------------------------------|---------|------------|-----------------------------|
|           | IRMA                 | RIA    | Nb2    | big big PRL                    | big PRL | Little PRL |                             |
| Grupo I   |                      |        |        |                                |         |            |                             |
| 1         | 62.0                 | 36.7   | 81.3   | 91.8                           | 3.2     | 5.0        | 39.8                        |
| 2         | 71.7                 | 34.7   | 84.1   | 83.4                           | 7.3     | 9.3        | 47.3                        |
| 3         | 82.5                 | 33.6   | 95.5   | 79.6                           | 5.8     | 14.6       | 55.3                        |
| 4         | 101.7                | 55.1   | 168.4  | 71.6                           | 16.1    | 12.3       | 61.4                        |
| 5         | 67.3                 | 29.0   | 98.6   | 87.0                           | 5.6     | 7.5        | 42.4                        |
| 6         | 74.4                 | 42.4   | 143.6  | 85.3                           | 5.3     | 9.4        | 51.2                        |
| 7         | 28.8                 | 18.4   | 43.5   | 81.7                           | 5.8     | 12.5       | 34.2                        |
| 8         | 27.2                 | 22.0   | 39.0   | 89.8                           | 8.7     | 5.6        | 30.3                        |
| Grupo II  |                      |        |        |                                |         |            |                             |
| 1         | 36.0                 | 33.1   | 50.4   | 0.0                            | 2.8     | 97.2       | 3.1                         |
| 2         | 35.7                 | 34.8   | 36.4   | 2.5                            | 5.2     | 92.3       | 4.3                         |
| 3         | 25.5                 | 21.4   | 28.6   | 1.8                            | 5.0     | 93.2       | 2.2                         |
| 4         | 55.6                 | 49.5   | 65.6   | 0.0                            | 2.6     | 97.4       | 2.4                         |
| 5         | 86.8                 | 80.5   | 74.4   | 0.0                            | 3.2     | 96.8       | 1.7                         |
| 6         | 35.6                 | 27.8   | 42.4   | 2.7                            | 10.8    | 86.5       | 1.9                         |
| 7         | 48.1                 | 33.1   | 48.8   | 5.1                            | 6.0     | 88.9       | 2.4                         |
| 8         | 58.1                 | 61.1   | 43.2   | 4.1                            | 9.6     | 86.3       | 0.8                         |
| 9         | 64.1                 | 50.2   | 36.0   | 0.0                            | 3.7     | 96.3       | 1.2                         |
| 10        | 34.9                 | 25.4   | 31.3   | 0.0                            | 6.4     | 93.6       | 1.4                         |
| 11        | 42.0                 | 31.8   | 36.2   | 1.2                            | 10.7    | 88.1       | 2.5                         |
| 12        | 57.8                 | 61.4   | 59.3   | 0.0                            | 6.3     | 93.7       | 0.9                         |
| Grupo III |                      |        |        |                                |         |            |                             |
| 1         | 69.4                 | 69.9   | 79.8   | 0.0                            | 0.0     | 100        | 0.0                         |
| 2         | 22.7                 | 20.3   | 29.3   | 0.0                            | 5.0     | 95.0       | 0.4                         |
| 3         | 38.2                 | 30.0   | 28.0   | 0.0                            | 9.4     | 90.6       | 1.1                         |
| 4         | 50.1                 | 46.6   | 36.0   | 0.0                            | 5.3     | 94.7       | 0.0                         |
| 5         | 40.8                 | 39.7   | 33.1   | 0.5                            | 13.3    | 86.2       | 1.4                         |
| 6         | 42.6                 | 45.6   | 33.2   | 0.0                            | 0.0     | 100        | 0.8                         |
| 7         | 28.7                 | 30.7   | 33.2   | 0.0                            | 1.1     | 98.9       | 0.4                         |
| Grupo IV  |                      |        |        |                                |         |            |                             |
| 1         | 12.3                 | 9.2    | 10.4   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 2         | 16.5                 | 13.6   | 10.1   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 3         | 13.4                 | 12.8   | 10.3   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 4         | 14.4                 | 14.6   | 13.1   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 5         | 16.2                 | 14.1   | 15.0   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| Grupo V   |                      |        |        |                                |         |            |                             |
| 1         | 53.4                 | 53.8   | 55.1   | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 2         | 1739.8               | 1454.0 | 1071.2 | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 3         | 192.0                | 158.3  | 180.0  | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 4         | 321.2                | 285.0  | 276.0  | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 5         | 192.7                | 157.2  | 164.8  | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 6         | 1134.5               | 1054.5 | 776.0  | NR                             | NR      | NR         | NR                          |
| 7         | 1689.5               | 1344.4 | 1125.6 | NR                             | NR      | NR         | NR                          |

<sup>a</sup> Filtración en gel (Sephadex G-200)

<sup>b</sup> PRL retenida por columna de Sepharose-proteína G (PRL retenida/PRL no retenida + retenida  $\times$  100)

NR = No realizado.

Tabla 3. Niveles de PRL sérica medida por IRMA, RIA y bioensayo en células Nb2. Distribución de la PRL sérica inmunorreactiva por IRMA en tres fracciones después de la cromatografía de filtración en gel y por cromatografía de afinidad en proteína G.

| Grupo                                | N  | PRL (ng/mL)   |               |               | Relaciones                                |               |               | Cromatografía (%) <sup>a</sup>    |           |             | Proteína G (%) <sup>b</sup> |
|--------------------------------------|----|---------------|---------------|---------------|-------------------------------------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
|                                      |    | IRMA          | RIA           | Nb2           | RIA/IRMA                                  | Nb2/IRMA      | Nb2/RIA       | big big PRL                       | big PRL   | little PRL  |                             |
| I                                    | 8  | 64.5 ± 25.5 * | 34.0 ± 11.6   | 94.3 ± 44.5 * | 0.56 ± 0.26 ¶                             | 1.46 ± 0.26 ¶ | 2.68 ± 0.56 ¶ | 83.8 ± 6.4 §                      | 7.2 ± 3.9 | 9.5 ± 3.4 § | 45.2 ± 10.6 §               |
| II                                   | 12 | 48.4 ± 17.0   | 42.5 ± 18.0   | 46.1 ± 14.2   | 0.87 ± 0.12                               | 0.93 ± 0.20   | 1.16 ± 0.29   | 1.5 ± 1.8                         | 6.0 ± 2.9 | 92.5 ± 4.1  | 2.1 ± 1.0                   |
| III                                  | 7  | 41.8 ± 15.2   | 40.4 ± 16.0   | 37.5 ± 19.1   | 0.96 ± 0.10                               | 0.95 ± 0.24   | 0.99 ± 0.25   | 0.07 ± 0.2                        | 4.9 ± 5.1 | 95.1 ± 5.2  | 0.6 ± 0.5                   |
| IV                                   | 5  | 14.5 ± 1.8    | 12.9 ± 2.2    | 11.8 ± 2.2    | 0.88 ± 0.10                               | 0.81 ± 0.13   | 0.86 ± 0.24   | NR                                | NR        | NR          | NR                          |
| V                                    | 7  | 760.4 ± 741.7 | 643.9 ± 614.4 | 521.2 ± 457.1 | 0.87 ± 0.08                               | 0.86 ± 0.05   | 0.93 ± 0.16   | NR                                | NR        | NR          | NR                          |
| t Student para muestras dependientes |    |               |               |               | ANOVA p = 0.0001                          |               |               | ANOVA p = 0.0001                  |           |             |                             |
| * p ≤ 0.008 vs. RIA                  |    |               |               |               | ¶ p ≤ 0.002 vs. II, III, IV, V. (Scheffé) |               |               | § p = 0.0001 vs II, III (Scheffé) |           |             |                             |

Datos expresados como media ± DE

NR = no realizado

<sup>a</sup> Filtración en gel (Sephadex G-200)

<sup>b</sup> PRL retenida por la columna de Sepharose-proteína G (PRL retenida/PRL no retenida + retenida × 100)

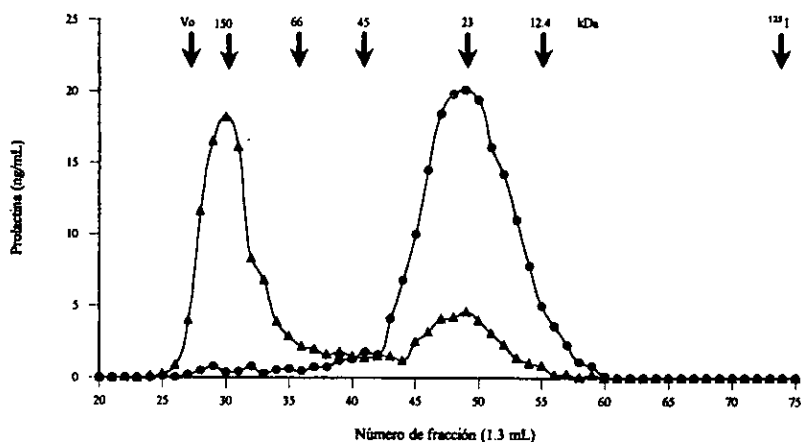


Figura 5. Perfil por cromatografía de filtración en gel (columna de 1.5 x 56 cm de Sephadex G-200) de la prolactina sérica en un pool de sueros con autoanticuerpos anti-PRL (▲) y en un pool de sueros sin autoanticuerpos anti-PRL (●).

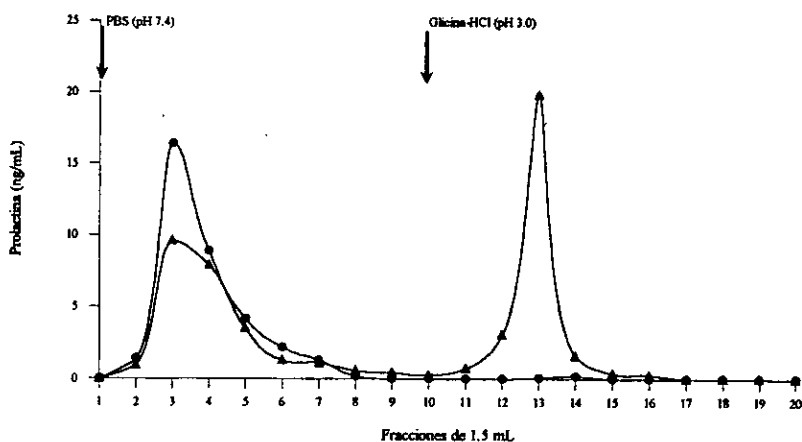


Figura 6. Perfil por cromatografía de afinidad con proteína G (columna de 1 mL de proteína G acoplada a Sepharose CL-4B) de la prolactina sérica en un pool de sueros con autoanticuerpos anti-PRL (▲) y en un pool sin autoanticuerpos anti-PRL (●).

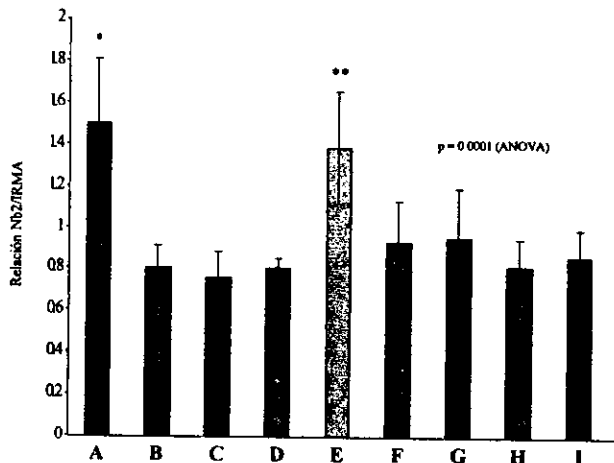
### ***Mediciones de prolactina sérica por IRMA, RIA y Nb2***

Los niveles de PRL sérica medidos por tres métodos se muestran en la tabla 3, como puede verse, sólo en el grupo I, los valores de PRL medidos por RIA fueron significativamente más bajos que los medidos por IRMA o Nb2 ( $34.0 \pm 11.6$  ng/mL vs.  $64.5 \pm 25.5$  ng/mL y  $94.3 \pm 44.5$  ng/mL, respectivamente [ $p \leq 0.008$ ]) y sin diferencia entre IRMA y Nb2. En los demás grupos de pacientes con LES y en los sueros controles no hubo diferencia entre los tres métodos empleados. La comparación entre las relaciones de los diferentes métodos usados para medir la PRL sérica (tabla 3), mostraron diferencias significativas en todas las comparaciones en el grupo I y semejantes en el resto de los grupos. La relación RIA/IRMA fue significativamente menor (grupo I:  $0.56 \pm 0.26$  vs. grupo II:  $0.87 \pm 0.12$ , grupo III:  $0.96 \pm 0.10$ , grupo IV:  $0.88 \pm 0.10$ , y grupo V:  $0.87 \pm 0.08$  [ $p = 0.002$ ]), la relación Nb2/IRMA fue significativamente mayor (grupo I:  $1.46 \pm 0.26$  vs. grupo II:  $0.93 \pm 0.20$ , grupo III:  $0.95 \pm 0.24$ , grupo IV:  $0.81 \pm 0.13$ , y grupo V:  $0.86 \pm 0.05$  [ $p = 0.002$ ]), de igual forma, la relación Nb2/RIA fue significativamente mayor (grupo I:  $2.68 \pm 0.56$  vs. grupo II:  $1.16 \pm 0.29$ , grupo III:  $0.99 \pm 0.25$ , grupo IV:  $0.86 \pm 0.24$ , y grupo V:  $0.93 \pm 0.16$  [ $p = 0.002$ ]).

### ***Relación Nb2/IRMA en las isoformas de la prolactina***

La inmunorreactividad de la PRL en las fracciones de filtración en gel que contenían las isoformas big big PRL y little PRL sólo se hizo por IRMA, debido a que con esta técnica los autoanticuerpos anti-PRL no interfirieron en las mediciones de la PRL (77) y además porque no mostró diferencia significativa en las mediciones de la PRL sérica por células Nb2 en todos los grupos estudiados. La figura 7, muestra la relación Nb2/IRMA, como puede verse, la media de la relación Nb2/IRMA de la isoforma big big PRL obtenida por filtración en gel y en suero total de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL fue semejante ( $1.5 \pm 0.31$  y  $1.46 \pm 0.267$ , respectivamente [ $p = 0.99$ ]), pero las medias de estas relaciones fueron significativamente mayores ( $p \leq 0.02$ ) que para la isoforma monomérica de PRL (little PRL) obtenida por filtración en gel de las mismas pacientes con autoanticuerpos anti-PRL ( $0.8 \pm 0.11$ ) y de los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL sin o con actividad lúpica ( $0.76 \pm 0.12$  y  $0.80 \pm 0.05$ ,

respectivamente), así como del suero total de las pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL sin o con actividad lúpica ( $0.93 \pm 0.20$  y  $0.95 \pm 0.24$ , respectivamente) y de las mujeres normales ( $0.81 \pm 0.13$ ) y con prolactinoma ( $0.86 \pm 0.05$ ). No hubo diferencia significativa en las medias de la relación Nb2/IRMA entre todas las formas little PRL obtenidas por filtración en gel, el suero de los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL y el suero de sujetos normales o con prolactinoma ( $p \geq 0.86$ ).



**Figura 7.** Determinación de la relación de la relación Nb2/IRMA de las isoformas de PRL obtenidas por filtración en gel de los sueros y en suero total. Los datos están expresados como media  $\pm$  DE. A. big big PRL ( $1.50 \pm 0.31$ ); B. little PRL de los sueros con autoanticuerpos anti-PRL ( $0.80 \pm 0.11$ ); C. little PRL de los sueros sin autoanticuerpos anti-PRL y sin actividad lúpica ( $0.76 \pm 0.12$ ); D. little PRL de los sueros sin autoanticuerpos anti-PRL y con actividad lúpica ( $0.80 \pm 0.05$ ); E. sueros con autoanticuerpos anti-PRL ( $1.46 \pm 0.26$ ); F. sueros sin autoanticuerpos anti-PRL y sin actividad lúpica ( $0.93 \pm 0.20$ ); G. sueros con autoanticuerpos anti-PRL y con actividad lúpica ( $0.95 \pm 0.24$ ); H. sueros de mujeres normales ( $0.81 \pm 0.13$ ); e I. sueros de pacientes con prolactinoma ( $0.86 \pm 0.05$ ).

Prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey:

\*  $p = 0.0001$  vs. B, C, D, F, G, H e I.

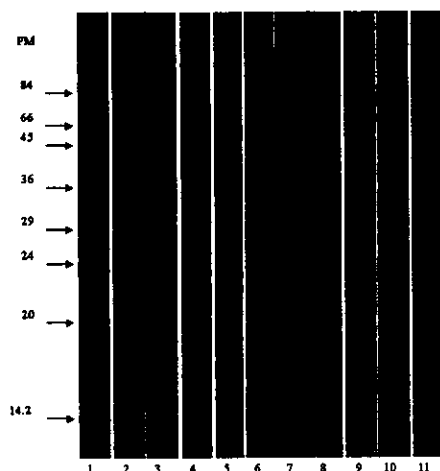
\*\*  $p \leq 0.02$  vs. B, C, D, F, G, H e I.

### ***Análisis por Western-blot***

La figura 8, muestra los patrones electroforéticos de la PRL encontrados en las muestras estudiadas. Cuando las fracciones de filtración en gel que contenían big big PRL fueron analizadas por SDS-PAGE, mostraron una banda en el Western blot, esta banda fue una proteína de 23 kDa. En cambio, las fracciones de filtración en gel que contenían little PRL o el suero total de pacientes con o sin autoanticuerpos anti-PRL o de los sujetos normales mostraron una banda 23 kDa y algunos otra banda de menor intensidad de 25 kDa. El suero total de las pacientes con adenoma hipofisiario productor de PRL mostraron tres bandas, la principal de 23 kDa, otra de 25 kDa y una tercera de menor intensidad de 22 kDa. La hPRL (NIDKK, la cual no fue inmunoprecipitada) también mostró las bandas de 25 y 23 kDa, así como otras (~ 60, 48, 20, 16.5 y 16 kDa), estas mismas bandas, excepto la de 25 kDa (PRL glicosilada), se observaron cuando se empleó la PRL humana recombinante (rechPRL), (Genzyme, la cual tampoco fue inmunoprecipitada). Finalmente, ninguna banda se observó cuando el suero de conejo normal fue la muestra inmunoprecipitada.

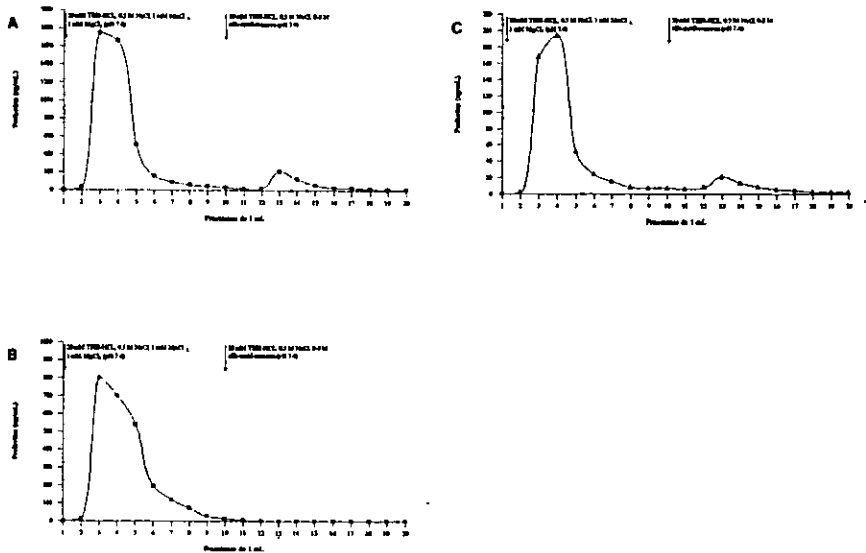
### ***Inmunorreactividad por IRMA de la PRL glicosilada***

La única diferencia por Western blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-hPRL, fue que las fracciones de filtración en gel con big big PRL sólo estaba presente la PRL de 23 kDa, en contraste, en las fracciones de filtración en gel con little PRL o en el suero total de los pacientes con LES (con o sin autoanticuerpos anti-PRL), como en el suero total de las mujeres sanas y con prolactinomas además de mostrar la PRL de 23 kDa, también estaba presente otra forma de la PRL de 25 kDa. De igual manera, la única diferencia entre la hPRL y la rechPRL, fue la ausencia de la PRL de 25 kDa en la rechPRL. Por lo anterior, se decidió probar si la PRL de 25 kDa presente en estas muestras era una forma glicosilada de la PRL (PRL-G), para lo cual se realizó cromatografía de afinidad en una columna de lectina (concanavalina A) acoplada a sepharose (HiTrap Con A, Amersham Pharmacia Biotech) (anexo 3). Además, con este procedimiento podíamos saber si el estuche comercial de IRMA que empleamos y que utiliza dos anticuerpos monoclonales en su sistema también detectaba esta forma de la PRL.



**Figura 8.** Patrones electroforéticos de la prolactina. Las muestras con PRL fueron sujetas a SDS-PAGE en un gel al 12% en condiciones reductoras. Las moléculas de PRL fueron identificadas por Western blot usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-hPRL (NIDDK anti-hPRL). Las bandas fueron detectadas con antisuero de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa y el desarrollo de la tinción con diaminobencidina. Carril 1: PRL humana hipofisiaria (NIDDK hPRL); Carril 2: PRL humana recombinante (Genzyme); Carril 3: Patrón en las fracciones de filtración en gel con big big PRL; Carril 4 - 5: Patrones en las fracciones de filtración en gel con little PRL (en los pacientes con o sin autoanticuerpos anti-PRL); Carril 6 - 7: Patrones de los sueros de los pacientes con o sin autoanticuerpos anti-PRL; Carril 8: suero normal; Carril 9: suero de una paciente con prolactinoma; Carril 10: estándar comercial de PRL (Cis bio International, France); y Carril 11: suero de conejo normal.

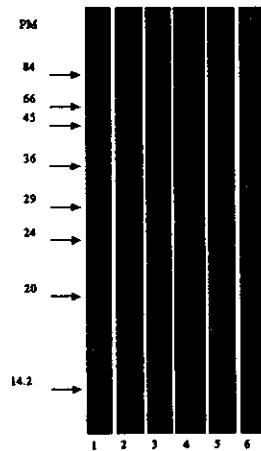
Los perfiles de cromatografía de afinidad con Concanavalina A se muestran en la figura 9. La rechPRL que no contiene la forma de la PRL de 25 kDa, no fue retenida prácticamente por la columna, en cambio la hPRL y la PRL del suero de una mujer con prolactinoma, que si muestran la forma de 25 kDa, el 12.5% y 13.5% de la PRL inmunorreactiva fue retenida por la columna. El porcentaje de recuperación de la PRL por las columnas fue para la rechPRL de 93.3%, para la hPRL de 92.3% y para el suero de 87.4%.



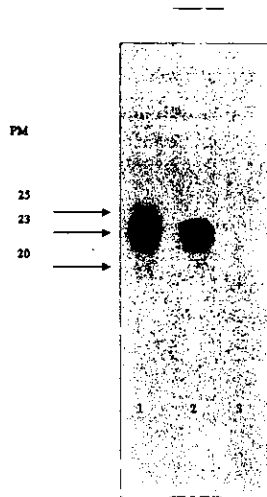
**Figura 9.** Perfil por cromatografía de afinidad con Concanavalina A (columna de 1 mL de Concanavalina A acoplada a Sepharose CL-4B) de la PRL por IRMA. A. hPRL (NIDDK hPRL) el 12.1% de la PRL total fue retenida por la columna; B. rechPRL (Genzyme) el 0.23% de la PRL total fue retenida; y C. suero total de una paciente con prolactinoma, el 13.5% de la PRL total fue retenida.

El análisis por Western blot de las muestras separadas por la columna de Concanavalina A se muestra en la figura 10, cuando el pico de las fracciones no retenidas por la columna fueron inmunoprecipitadas, mostraron una banda de 23 kDa, en cambio el pico de las fracciones retenidas por la columna mostraron una banda de 25 kDa (PRL glicosilada). El Western blot de la hPRL y de la rechPRL, pero esta vez incubando las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal anti-hPRL marcado con  $^{125}\text{I}$  del estuche comercial de IRMA y detectado por autoradiografía, se muestran en la figura 11; en la hPRL se detectaron tres bandas, la de mayor intensidad de 23 kDa, otra de menor intensidad de 25 kDa y otra muy tenue de 20 kDa; en la rechPRL, sólo se detectaron dos bandas, la de mayor intensidad de 23 kDa y la tenue de 20 kDa. Además, este anticuerpo

no detectó la rPRL (NIDDK). Lo anterior demostró que la PRL de 25 kDa es una forma glicosilada de la PRL y los anticuerpos monoclonales del estuche comercial de IRMA detectan la forma no glicosilada de la PRL, como la glicosilada y además no muestran reacción cruzada con la rPRL.



**Figura 10.** Patrones electroforéticos de las muestras por cromatografía de afinidad con Concanavalina A. Las fracciones No. 3 y 13 fueron sujetas a SDS-PAGE en un gel al 12% en condiciones reductoras. Las moléculas de PRL fueron identificadas por Western blot usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-hPRL (NIDDK hPRL). Las bandas fueron detectadas con antisuero de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa y el desarrollo de la tinción con diaminobencidina. Carril 1: PRL humana hipofisiaria (NIDDK hPRL); Carril 2: fracción No. 3 de hPRL; Carril 3: fracción No. 13 de hPRL; Carril 4: PRL humana recombinante (Genzyme); Carril 5: fracción No. 3 de rechPRL; y Carril 6: fracción No. 13 de rechPRL.

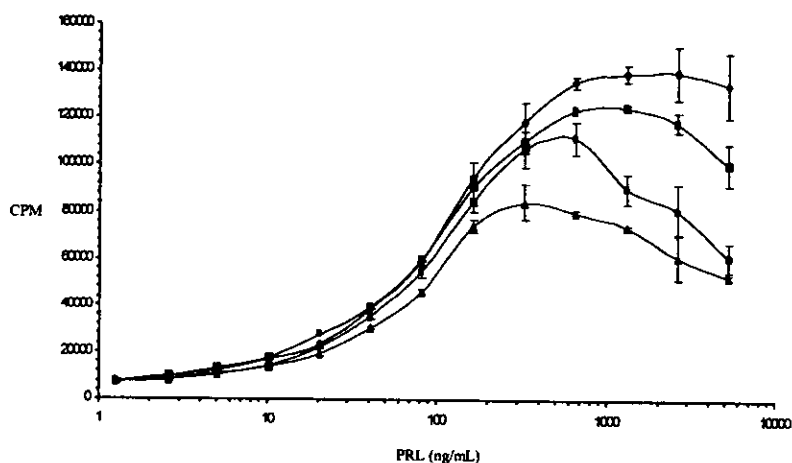


**Figura 11.** Patrones electroforéticos de la prolactina. Las muestras con PRL fueron sujetas a SDS-PAGE en un gel al 12% en condiciones reductoras. Las moléculas de PRL fueron identificadas por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-hPRL marcado con  $^{125}\text{I}$  (Cis bio International, France). Las bandas fueron detectadas por autoradiografía. Carril 1: PRL humana hipofisiaria (NIDDK); Carril 2: PRL humana recombinante (Genzyme); Carril 3: PRL hipofisiaria de rata (NIDDK rPRL).

### ***Efecto de las diferentes muestras con PRL en la proliferación de células Nb2***

El análisis por Western blot de la big big PRL (complejo PRL-IgG), mostró que la PRL unida al autoanticuerpo fue exclusivamente de 23 kDa, en cambio, en las fracciones de filtración en gel con little PRL y en suero total además de la PRL de 23 kDa, también estaba presente la PRL glicosilada (25 kDa). De igual forma, la presencia de la PRL glicosilada en la hPRL fue la característica distintiva por Western blot de la rechPRL. Estos datos, junto a la mayor actividad biológica en células Nb2 encontrada en las fracciones con big big PRL, nos hizo sospechar que la PRL no glicosilada pudiera tener mayor actividad biológica en las células Nb2 que la PRL glicosilada. La figura 12, muestra la actividad biológica de células Nb2 por diferentes concentraciones y tipos de muestras con PRL. La curva dosis-respuesta de la big big PRL (complejo PRL-IgG) obtenida por filtración en gel de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL mostró tener la mayor actividad proliferativa en células Nb2 y fue similar la respuesta por la rechPRL,

ambas sin la presencia de PRL glicosilada. Cuando se usó el suero de una paciente con LES sin autoanticuerpos anti-PRL, cuya forma molecular por filtración en gel fue casi exclusivamente little PRL y que por Western blot contenía principalmente PRL no glicosilada y en menor grado PRL glicosilada, la respuesta proliferativa fue menor. Finalmente, cuando se probó la hPRL (el estándar que se utilizó en los bioensayos para calcular la relación Nb2/IRMA) fue la que tuvo la respuesta proliferativa más baja.



**Figura 12.** Evaluación del efecto de dosis incrementadas de big big PRL (complejo PRL-IgG) obtenido por filtración en gel de pacientes con autoanticuerpos anti-PRL (♦), rechPRL (■), suero de una paciente con LES sin autoanticuerpos anti-PRL y con presencia en suero de PRL de 23 kDa y 25 kDa en menor proporción (●), y PRL humana hipofisiaria (▲) sobre la estimulación del crecimiento en células de linfoma Nb2. El crecimiento celular fue determinado a los 3 días por medio de la incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Los datos representan la media  $\pm$  EE de las mediciones hechas por triplicado. Los valores de la ED<sub>50</sub> para las cuatro muestras fueron: 104.2 pg/mL, 110.5 pg/mL, 124.6 pg/mL y 161.1 pg/mL, respectivamente.

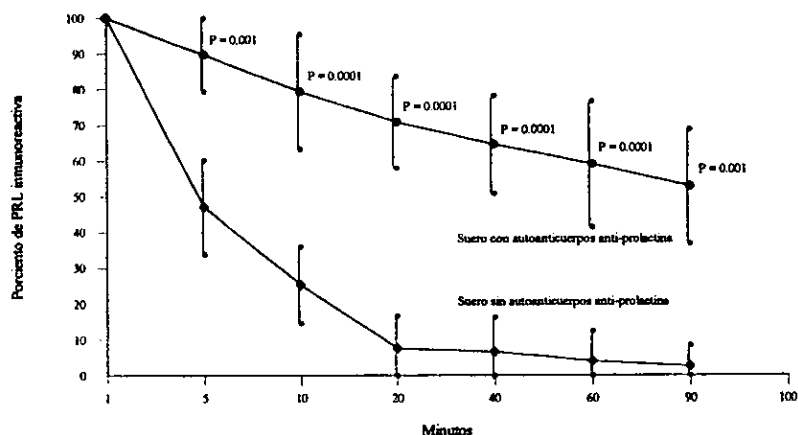
La big big PRL tuvo una respuesta proliferativa máxima a la concentración de 1,257.6 pg/mL; la respuesta proliferativa a esta misma dosis con rechPRL no mostró diferencia. En cambio, la respuesta proliferativa fue significativamente menor en el suero y la hPRL a la misma dosis (ANOVA  $p = 0.0001$ ). Todas las curvas dosis respuesta mostraron un fase ascendente (estimulación máxima) y posteriormente tuvieron una disminución de la

respuesta proliferativa al incrementar la concentración de PRL, la estimulación máxima para la big big PRL y rechPRL fue de 1257.6 pg/mL, para el suero de 648.2 pg/mL y para la hPRL de 324.4 pg/mL.

La ED<sub>50</sub> para la big big PRL fue de 104.2 pg/mL, para la rechPRL de 110.5 pg/mL, para el suero de 124.6 pg/mL y para la hPRL de 161.1 pg/mL. Estos resultados indican que la big big PRL en esta prueba es 1.55 veces más activa que la hPRL, 1.20 más que el suero y semejante (1.06) que la rechPRL.

#### ***Aclaramiento plasmático del complejo PRL-IgG***

Las curvas de aclaramiento plasmático de la inyección intravenosa del suero total de los pacientes con LES con o sin autoanticuerpos anti-PRL en ratas se muestran en la figura 13. El porcentaje de la PRL humana inmunorreactiva en el plasma de la rata cuando fue inyectado el suero de pacientes con autoanticuerpos anti-PRL fue significativamente mas alto desde el minuto 5 hasta el minuto 90 que duró el experimento ( $p \leq 0.001$ ). Más del 50% de la PRL del suero de los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL fue depurada de la circulación sanguínea de la rata al minuto cinco, en cambio, más del 50% de la PRL del suero de los pacientes con autoanticuerpos aún permanecía en el suero de la rata hasta el minuto 90. Lo anterior muestra claramente que el complejo PRL-IgG es removido de la sangre más lentamente que la forma libre o monomérica de la PRL.



**Figura 13.** Curvas de desaparición de la PRL humana inmunorreactiva del plasma de ratas anestesiadas después de la administración intravenosa de 1 mL de suero de pacientes con LES con autoanticuerpos anti-PRL,  $n = 7$  (●) o sin autoanticuerpos anti-PRL,  $n = 7$  (◆). Los valores representan la media  $\pm$  DE del porcentaje de la PRL inmunorreactiva en cada tiempo con respecto al minuto 1. El valor de  $p$  es la comparación entre cada tiempo ( $t$  de Student para muestras dependientes).

## ***Discusión***

Estudios recientes han aportado evidencias que sugieren que la PRL puede tener un papel patogénico en varios trastornos autoinmunes (105). Específicamente en LES, la enfermedad es más frecuente en mujeres en edad reproductiva y tiende a exacerbarse o aparecer durante el embarazo, lo que indica que las hormonas reproductivas influyen en esta enfermedad. En el modelo murino (NZB/W) que padece una enfermedad similar al LES, se ha demostrado claramente que la PRL influye en el curso de la enfermedad, en donde el proceso de autoinmunidad esta acelerado y ocurre una mortalidad temprana cuando se provoca hiperprolactinemia por trasplante singénico de glándulas hipofisiarias (8,9). En los pacientes con LES se han reportado niveles séricos elevados de PRL (65,66) e incluso, la frecuencia de hiperprolactinemia es de 15 – 30% (68,70-72,93), en contraste a los modelos murinos, los estudios realizados en humanos, han dado resultados controversiales e inconsistentes, algunos estudios muestran una asociación entre hiperprolactinemia y actividad de la enfermedad (68,72), pero otros reportes no confirman esta asociación (70, 71,73), sin embargo, muchos de estos estudios involucran un número relativamente pequeño de pacientes y muestran un bajo poder estadístico del estudio (75). Otra explicación a los estudios que no muestran asociación entre PRL y LES es el hecho de no haberse considerado las diferentes isoformas de la PRL que pueden ser encontradas en la circulación sanguínea. Con respecto a este punto, el advenimiento de las técnicas para cuantificar PRL muestran resultados variables entre las mismas muestras (106), en donde, la presencia de formas moleculares de la PRL de alto peso molecular con una técnica puede dar resultados altos y con otra resultados más bajos o incluso dentro de rangos normales. La presencia de autoanticuerpos anti-PRL ha mostrado interferir en la estimación de los niveles verdaderos de PRL en algunas técnicas de RIA de uno o dos anticuerpos (77,106-108). En un estudio reciente que involucró un gran número de pacientes con LES, encontramos que el incremento de los niveles séricos de PRL fue una variable asociada en forma independiente a la actividad lúpica (77), asimismo en un subgrupo de estos pacientes clasificados con hiperprolactinemia

idiopática se encontró que el 40.7% presentaba una forma de la PRL de alto peso molecular, la cual esta formada por un autoanticuerpo anti-PRL y la PRL. De manera interesante, los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL tenían menor actividad clínica y serológica de la enfermedad en comparación a los pacientes con hiperprolactinemia idiopática pero sin la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (93). Estos datos sugieren que la determinación de PRL sérica inmunorreactiva en forma aislada no correlaciona con las manifestaciones clínicas en un subgrupo de pacientes con LES y por lo tanto, esta sea una razón más que explique las controversias entre LES y PRL.

Los pacientes del grupo I tenían hiperprolactinemia persistente, detectada por lo menos 13 meses antes del estudio y en todas las ocasiones mostró que el suero contenía big big PRL como la forma predominante. La proporción de la PRL de alto peso molecular separada por dos métodos fueron diferentes, por cromatografía de afinidad con proteína G fue de  $45.2 \pm 10.6\%$  y por filtración en gel de  $83.8 \pm 6.4\%$ . Estos resultados pudieron ser debidos a tres posibles causas que no pueden ser excluidas: 1) disociación de la PRL de la IgG durante el proceso de purificación en la columna de proteína G, resultando en una subestimación de la PRL unida a IgG, 2) presencia de otras formas de alto peso molecular de la PRL no asociadas a autoanticuerpos y 3) presencia de autoanticuerpos anti-PRL de un isotipo diferente a la IgG, como Ig M o Ig A, como ocurre con otros autoanticuerpos contra autoantígenos encontrados en el suero de pacientes con LES y que no son unidos por la proteína G. Estos casos tienen mucha similitud a la macroprolactinemia no asociada a autoanticuerpos anti-PRL, la cual se caracteriza por hiperprolactinemia persistente y ausencia de signos clínicos de hiperprolactinemia (trastornos menstruales y/o galactorrea) (81,83,88). Las pacientes de este estudio con autoanticuerpos anti-PRL ninguna presentaba trastornos menstruales y/o galactorrea e incluso una de ellas (caso 1) posterior al diagnóstico de autoanticuerpos anti-PRL logró un embarazo a término sin tratamiento para la hiperprolactinemia, en cambio las pacientes del grupo II y III (sin autoanticuerpos anti-PRL), cuya forma circulante en sangre por filtración en gel fue la little PRL, el 30% y 57.1%, respectivamente tenían trastornos menstruales. De igual forma, las pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, ninguna tenía una causa que explicara el aumento en los niveles séricos de PRL, en cambio, el 41.7% y

71.4% de las pacientes del grupo II y III tenían causas que pudieron explicar la hiperprolactinemia. Si bien, las pacientes estudiadas en este grupo no se seleccionaron en forma aleatorizada, sólo una de ellas tenía actividad lúpica al momento del estudio, con manifestaciones serológicas y articulares, previo al estudio esta paciente, como el resto del grupo I se habían mantenido sin actividad clínica.

Los niveles de PRL sérica en las pacientes del grupo I fueron más elevados que los del grupo II y III, pero no fueron significativamente diferentes, debido a que las pacientes del grupo II y III fueron incluidas sólo si tenían hiperprolactinemia. En el suero de las pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, la concentración de PRL por IRMA fue significativamente más alta que la obtenida por RIA, en cambio, en el resto de los grupos fue la misma, estos datos son consistentes a lo reportado previamente por nosotros, en donde la presencia de autoanticuerpos anti-PRL interfiere con las mediciones de PRL por RIA de doble anticuerpo subestimando los valores reales de PRL, en cambio el rendimiento de la técnica de IRMA empleada no es afectada por la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (77,107).

Dado que los pacientes con LES, hiperprolactinemia y autoanticuerpos anti-PRL tenían menor actividad de la enfermedad que aquellos con hiperprolactinemia pero sin autoanticuerpos anti-PRL, especulamos que la PRL unida a la IgG podría tener baja actividad biológica. Sin embargo y todo lo contrario, la actividad biológica en células Nb2, tanto del suero total, como de las fracciones séricas que contenían big big PRL por filtración en gel de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL fue mayor que la de los sueros del grupo II al V, como de las fracciones séricas que contenían little PRL (forma libre de PRL) por filtración en gel, tanto de los pacientes con o sin autoanticuerpos anti-PRL e independientemente de la actividad de la enfermedad. Los autoanticuerpos anti-PRL parece que no enmascaran los sitios importantes para su actividad biológica; entonces, por qué los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL carecen de signos clínicos de hiperprolactinemia (*in vivo*) a pesar de que el complejo PRL-IgG es completamente biactivo e incluso más que de la forma libre de PRL *in vitro*. Una posibilidad es una anomalía en los receptores de PRL o en las vías de transducción post-receptor, pero esto parece improbable desde un punto de vista clínico, en el caso 1, la paciente se

embarazó y al avanzar la gestación se le detectó un incremento en la forma libre de PRL y al término del embarazo presentó galactorrea, cuya manifestación es dada por la hiperprolactinemia, lo que indica que la unión de la PRL a su receptor y sus mecanismos post-receptor están intactos. En células humanas de leucemia linfocítica crónica (células B), el complejo PRL-IgG obtenido de humanos ha mostrado ser co-estimuladora en su proliferación y esta acción proliferativa fue bloqueada cuando se incubaron previamente estas células con rechPRL libre y/o con fragmentos Fc (109), sugiriendo que en estas células, sólo cuando el receptor de la PRL y del Fc para inmunoglobulinas es entrecruzado al acoplarse en ellos el complejo PRL-IgG desencadena la cascada de señales de transducción, sin embargo, esto no explica el aumento de la proliferación en las células Nb2 por el complejo PRL-IgG de estos pacientes con LES, debido a que las células Nb2 son derivadas de un linfoma de células pre-T y carecen de receptores para el Fc de las inmunoglobulinas e incluso, no podemos descartar que el complejo PRL- IgG aislado en ese estudio haya sido diferente al que encontramos en estos pacientes con LES, debido a que ese complejo PRL-IgG que provocó proliferación en las células leucémicas fue incapaz de inducir proliferación sobre las células Nb2. Otra posibilidad para explicar el aumento en la proliferación sobre las células Nb2 era la presencia de un factor sérico y que estuviera presente en las fracciones que contenían big big PRL en la filtración en gel y con actividad sobre las células Nb2 (110), sin embargo, esta posibilidad puede ser descartada prácticamente por el hecho que al utilizar el anticuerpo policlonal anti-hPRL y anti-hGH se abolió completamente la proliferación de células Nb2.

Una explicación más plausible del aumento de la bioactividad en las células Nb2 del complejo PRL-IgG surgió del análisis hecho por Western-blot, en donde la inmunoprecipitación de las fracciones que contenían big big PRL por filtración en gel era invariablemente una PRL de 23 kDa, en cambio, los sueros de los pacientes del grupo II al V, como de las fracciones que contenían little PRL por filtración en gel, además de la PRL de 23 kDa, estaba presente una PRL de 25 kDa. Así mismo, la hPRL hipofisiaria usada como estándar en las curvas de proliferación, contenía principalmente la banda de 23 kDa, pero también la de 25 kDa, como de otras bandas de menor intensidad. La PRL de 25 kDa, representa la forma monomérica de la PRL glicosilada y la unión de

carbohidratos a la PRL puede tener implicaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas de la hormona, independientemente de su inmunorreactividad (111,112). La forma glicosilada de la PRL porcina tiene dos veces menor actividad sobre la proliferación de células Nb2 que de la forma no glicosilada (113). Asimismo, utilizando rechPRL glicosilada y no glicosilada, se reporta que la forma glicosilada de la rechPRL fue 3 – 4 veces menor su actividad en la proliferación de células Nb2 que de la rechPRL no glicosilada (114). La hPRL usada como estándar en nuestros bioensayos, cuando fue pasada por la columna con concanavalina A encontramos que el 12.1% de la hormona estaba glicosilada (determinada por IRMA), un porcentaje similar de PRL glicosilada fue encontrada en el suero de una paciente con prolactinoma (13.5%). Las fracciones retenidas por la columna de concanavalina A cuando fueron inmunoprecipitadas y analizadas por Western-blot correspondieron a la PRL de 25 kDa. Estos datos, aunados al análisis por Western-blot usando el anticuerpo monoclonal anti-hPRL marcado con  $^{125}\text{I}$  del estuche comercial de IRMA, donde la autoradiografía mostró la presencia de tres bandas de PRL (23, 25 y 20 kDa), lo que indica que la técnica de IRMA que empleamos detecta formas glicosiladas y no glicosiladas de la hPRL.

Las curvas dosis-respuesta de diferentes muestras con PRL sobre la proliferación en células Nb2, mostraron que las fracciones por filtración en gel que contenían big big PRL fue 1.55 veces más activa que la hPRL usada como estándar en los bioensayos, de igual forma, la rechPRL, cuyo porcentaje de PRL glicosilada fue mínimo (0.23%) fue 1.46 veces más activa que la hPRL hipofisiaria. Estos datos sugieren que la PRL glicosilada tiene menor actividad biológica sobre las células Nb2 que la PRL no glicosilada. La relación Nb2/IRMA elevada en el suero con autoanticuerpos anti-PRL y en las fracciones por filtración en gel con big big PRL puede ser explicado porque toda o la mayor parte de la PRL unida al autoanticuerpo anti-PRL no esta glicosilada y además porque el estándar que usamos en nuestras curvas de proliferación contenía formas no glicosiladas y glicosiladas de la PRL, en cambio, cuando se comparó con una forma no glicosilada de la PRL tuvo una actividad biológica igual. La relación Nb2/IRMA de las muestras séricas y por filtración en gel de los grupos II al V fue cercana a 1, lo que puede indicar un porcentaje similar o mayor de PRL glicosilada a el estándar empleado. De igual forma, la

relación RIA/IRMA y Nb2/RIA en el suero de los grupos II al V fue cercana a la unidad, pero en el suero de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, la relación RIA/IRMA fue significativamente menor y la relación Nb2/RIA significativamente mayor, esto es explicado además de lo antes descrito en relación a la presencia de PRL glicosilada, debido a que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL interfiere con el sistema de RIA (77,114), ocasionando resultados falsamente bajos de la PRL.

La menor actividad clínica en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL no puede deberse a la falta de actividad biológica del complejo PRL-IgG. Más bien, el mecanismo para explicar por qué la PRL unida a la IgG no pueda ejercer su bioactividad *in vivo*, puede ser debido a que el acceso de la PRL a sus células blanco a través de la pared capilar esta restringido debido a su gran tamaño molecular o cambios en la carga neta de la molécula.

Hattori (91) estudió cuatro mujeres con autoanticuerpos anti-PRL sin enfermedad autoinmune, en donde la inmunorreactividad de la PRL fue medida por un ensayo inmuno-enzimático (EIA), encontrando una relación Nb2/EIA de  $1.3 \pm 0.3$  y no fue diferente a los sujetos normales o con prolactinomas, sin embargo, estos datos deben ser tomados con cautela con respecto a nuestros resultados, ya que a pesar de que menciona que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL no interfirió con la técnica de EIA que empleó, la sensibilidad de esta prueba fue de  $0.05 \mu\text{g/L}$ , veinte veces más baja que para su bioensayo ( $1 \mu\text{g/L}$ ), en cambio nosotros empleamos una técnica inmunoradiométrica con una sensibilidad semejante, pero nuestro bioensayo resultó mucho más sensible ( $3 \text{ pg/mL}$ ). Tampoco mencionó que estándar de PRL utilizó como referencia en sus bioensayos, pero al igual que nosotros encontró que la PRL del complejo PRL-IgG de sus pacientes fue una PRL de 23 kDa. En dos de sus cuatro pacientes la relación Nb2/EIA fue de 1.5 y 1.6, semejante a la encontrada por nosotros, pero debido al reducido número de pacientes y controles estudiados, aunado a no haber considerado la presencia de formas glicosiladas de la PRL en su estudio pueden explicar las diferencias entre sus resultados y los nuestros. De forma semejante, Leite (92), estudió 11 pacientes con autoanticuerpos anti-PRL sin enfermedad autoinmune, él utilizó dos métodos para medir la inmunorreactividad de la PRL, pero no mostró datos para determinar si los

autoanticuerpos anti-PRL interferían en sus pruebas, como sea, él encontró que los valores de big big PRL fueron significativamente más bajos cuando empleó una técnica de IRMA al compararla con una técnica de RIA. Sus datos mostraron en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL una relación Nb2/IRMA en suero total de  $1.57 \pm 0.61$ , semejante a la nuestra, pero esta relación fue menor en las fracciones de filtración en gel que contenían big big PRL ( $0.86 \pm 0.17$ ), a diferencia de nuestros resultados que fue semejante esta relación tanto en suero total, como en las fracciones por filtración en gel que contenían big big PRL. La discrepancia de sus resultados con respecto a los nuestros, puede ser explicada de forma semejante al estudio de Hattori, en donde, el estándar de hPRL que empleó en los bioensayos el análisis por Western-blot mostró que sólo contenía una banda de 23 kDa y otra de 48 kDa y además su bioensayo al igual que Hattori se basó en el recuento de células (Coulter) con la consiguiente menor sensibilidad, a diferencia de nosotros que usamos la incorporación de timidina tritiada, lo que hizo a nuestro bioensayo más sensible a la medición de PRL; finalmente, Leite tampoco determinó si la presencia de autoanticuerpos anti-PRL interfería en sus técnicas que empleó para medir la PRL inmunorreactiva.

Nosotros previamente demostramos que la técnica de IRMA que empleamos no da resultados erróneos de la concentración de PRL en presencia de autoanticuerpos anti-PRL (77,107) y en este estudio la técnica de IRMA mostró no diferir de las estimaciones de PRL tanto en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL como sin autoanticuerpos anti-PRL, en cambio fue diferente su estimación con RIA en los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL, pero semejante en los pacientes del grupo II al V. Todo lo anterior, sugiere que la relación Nb2/inmunorreactividad, tanto del complejo PRL-IgG, como de las formas libres de PRL dependen de la técnica empleada para medir la inmunorreactividad de la PRL, como la presencia y concentración de las isoformas de PRL (incluyendo el porcentaje de glucosilación) usados como estándar en las curvas de proliferación en células Nb2.

Las controversias en los estudios clínicos que abordan la asociación entre PRL y actividad lúpica, además de su bajo poder estadístico, puede ser explicado en base a las evidencias encontradas en el presente trabajo y que no se han considerado para su análisis

en los estudios hasta ahora publicados en pacientes con LES; como es la presencia de diferentes isoformas de la PRL, el grado de glucosilación de la PRL y el rendimiento de las técnicas para medir la concentración real, como de las isoformas de la PRL inmunorreactiva.

Nosotros previamente demostramos que en los pacientes con LES y autoanticuerpos anti-PRL existe una correlación significativa y positiva entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL, considerando que los autoanticuerpos anti-PRL pueden ser la causa que explicara la hiperprolactinemia en estos pacientes (77,93). Los estudios de aclaramiento plasmático usando ratas mostró que al inyectar el suero que contenía autoanticuerpos anti-PRL el aclaramiento de la PRL de la circulación sanguínea fue significativamente retardado que cuando se inyectó suero sin autoanticuerpos anti-PRL. La PRL debido a su unión con la IgG no es filtrada a través de los glomérulos y escapa a la eliminación por el riñón, de igual forma, el mecanismo de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico por los altos niveles de PRL esta bloqueado debido a que el complejo PRL-IgG no llega al hipotálamo a través de sus capilares. Estos datos sugieren que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL en los pacientes con LES puede ser la causa de la hiperprolactinemia.

En conclusión, se demostró que el complejo PRL-IgG de los pacientes con autoanticuerpos anti-PRL esta formado por la unión no covalente de una IgG a la PRL de 23 kDa y que tiene una actividad biológica completa *in vitro*. Estos datos sugieren que el complejo PRL-IgG no ejercen su actividad biológica *in vivo* debido a su alto peso molecular que le impide atravesar las paredes capilares para llegar a sus células blanco. De forma semejante, debido al alto peso molecular del complejo PRL-IgG, el aclaramiento plasmático de la PRL esta retardado y esto tiende al desarrollo de la hiperprolactinemia.

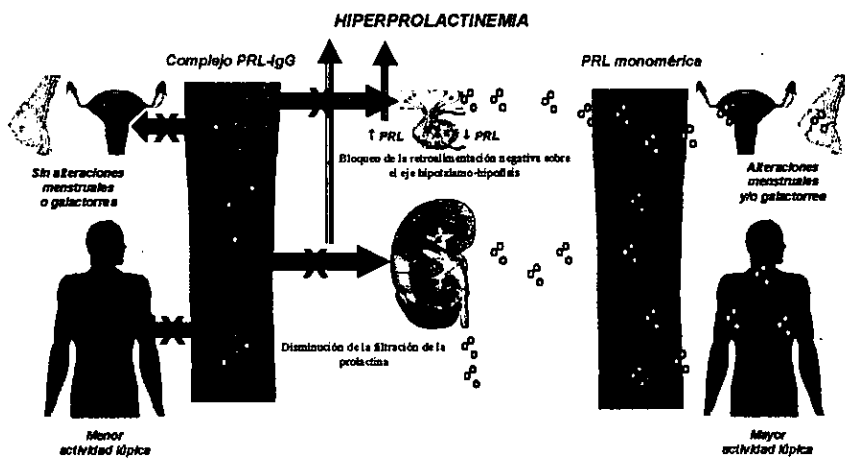


Figura 14. Mecanismo propuesto para la elevación de la concentración sérica de PRL y su menor actividad biológica *in vivo* en presencia de autoanticuerpos anti-PRL en pacientes con LES.

## ***Referencias***

1. Reeves WH, Lahita RG. Clinical presentation of systemic lupus erythematosus in the adult. In: Systemic Lupus Erythematosus. 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. Masi AT, Kaslow RA. Sex effects in systemic lupus erythematosus in the United States. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 480 - 483.
4. Kaslow RA, Masi AT. Age, sex, and race effects on mortality from systemic lupus erythematosus in the United States. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 473 - 479.
5. Frantz AG. Prolactin. *N Engl J Med* 1978; 298: 201 - 206.
6. Katz E, Adashi Y. Hyperprolactinemic disorders. *Clin Obstet Gynecol* 1990; 33: 622 - 639.
7. Berezil I. The immunology of prolactin. *Semin Reprod Endocrinol* 1992; 10: 196 - 219.
8. McMurray R, Keisler D, Kanuckel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol* 1991; 147: 780 - 787.
9. McMurray RW, Keisler D, Izui S, Walker SE. Hyperprolactinemia in male NZB/NZW (B/W) F1 mice: accelerated autoimmune disease with normal circulating testosterone. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71: 338 - 43.
10. Stricker P, Grueter F. Actions du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee lactee. *CR Soc Biol (Par)* 1929; 99: 1978 - 1980.
11. DeVlaming VL. Actions of prolactin among the vertebrates. In: *Hormones and Evolution*. New York: Barrington EJW, 1979: 561 - 642.
12. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4: 171 - 180.

13. Lamberts SWJ, MacLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990; 70: 279 - 318.
14. 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.
15. Frawley LH, Boockfor FR. Mammosomatotropes: Presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. 1991 *Endocr Rev*; 12: 337 - 355.
16. Handwerger S, Richards RG, Markoff E. The physiology of decidual prolactin and other decidual protein hormones. *Trends Endocrinol Metab*. 1990; 3: 91 - 95.
17. Fuxe K, Hokfelt T, Eneroth P, Gustafsson JA, Skett P. Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 1977; 196: 899 - 900.
18. Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD. Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology* 1984; 114: 1947 - 1949.
19. Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Zukoski CF. Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 1992; 131: 3019 - 3026.
20. DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 1988; 122: 2508 - 2517.
21. Pellegrini I, Lebrun J-J, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cell. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1023 - 1031.
22. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 751 - 754.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
  26. 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.
  27. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354 - 369.
  28. Maurer RA, Erwin CR, Donelson JE. Analysis of 5' flanking sequences and intron-exon boundaries of the rat prolactin gene. *J Biol Chem*; 256: 10524 - 10528.
  29. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* 1983; 4: 97 - 130.
  30. Maurer RA, Gorski J, McKean DJ. Partial ammino acid sequence of rat pre-prolactin. *Biochem J* 1977; 161: 189 - 192.
  31. Lingappa VR, Devillers-Thiery A, Blobel G. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 2432 - 2436.
  32. Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 35 - 42.
  33. Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. Prolactin (PRL) mRNA from human deciduas differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 64: 127 - 130.
  34. 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.
  35. Schettini G, Lorio T, Meucci O. Interleukin-1- $\beta$  modulation of prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: involvement of adenylate cyclase activity and calcium mobilization. *Endocrinology* 1990; 126: 1435 - 1441.

36. Yamaguchi M, Matsuzaki N, Hirota K. Interleukin 6 possibly induced by interleukin 1 $\beta$  in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122: 201 - 205.
37. Reichlin S. Neuroendocrinology. In: JD Wilson, DW Foster, eds. *Williams' Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992: 173 - 5, 203.
38. Thorner OM, Vqnnc LM, Horvqth EM, Kovqcs K. The anterior pituitary. In: JD Wilson, DW Foster, eds. *Williams' Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992: 226 - 228.
39. Ogawa N, Miyoshi M, Takahara J, Ofuji T. Inhibitory effects of glucocorticoids on prolactin release induced by thyrotropin-releasing hormone in man. *Acta Med Okayama* 1975; 4: 351 - 354.
40. Chen CL, Meites J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1970; 86: 503 - 508.
41. Nogami H. Fine structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 195 - 199.
42. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution of the tymus in the rat. *Anac Rec* 1930; 47: 119 - 129.
43. Nagy E, Berczi I. Immunodeficiency in hipophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 1978; 89: 530 - 537.
44. Nagy E, Berczi I, Friesen HG. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 102: 351 - 357.
45. Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovaks K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 1983; 6: 231 - 243.
46. 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.
47. Spangelo BL, MacLeod RM. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab* 1990; 1: 408 - 412.

48. Jones TH, Price A, Justice S, Chapman K. Interleukin-6 secretion by human pituitary adenomas in vivo (abstr). *J Endocrinol* 1990 (Suppl); 127: 86.
49. Bernton 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.
50. Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125: 575 - 577.
51. Russel 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.
52. Bazan JF. structural design and molecular evolution of a cytokine receptor super-family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6934 - 6938.
53. Yu-Lee LY, Stevens AM, Hrachovy JA, Schwartz LA. Prolactin-mediated regulation of gene transcription in lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1990; 594: 146.
54. Reber PM. Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 1993; 95: 637 - 644.
55. Schwartz LA, Stevens AM, Hrachovy JA, Yu-Lee L. Interferon regulatory factor-1 is inducible by prolactin, interleukin-2, and concanavalin A in T cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 86: 103 - 110.
56. Clevenger CV, Sillman AL, Hanley-Hyde J, Prystowsky MB. Requirement for prolactin during cell cycle regulated gene expression in cloned T-lymphocytes. *Endocrinology* 1992; 130: 3216 - 3222.
57. 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.
58. Cross RJ, Campbell JL, Rozsman TI. Potentiation of antibody responsiveness after the trasplantation of a syngenic pituitary gland. *J Neuroimmunol* 1989; 25: 29 - 35.

59. 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.
60. 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.
61. Ferrari C, Boghen M, Parrachi A. Thyroid autoimmunity in hyperprolactinemic disorders. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 35 - 41.
62. Hedner LP, Bynke G. Endogenous iridocyclitis relieved during treatment with bromocriptine. *Am J Ophthalmol* 1985; 100: 618 - 619.
63. 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.
64. Lever EG, McKerron CG. Auto-immune Addison's disease associated with hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol* 1984; 21: 451 - 457.
65. 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.
66. Folomeev M, Prokaeva T, Nasonova V. Prolactin levels in men with SLE and RA. *J Rheumatol* 1990; 17: 1569 - 1570.
67. Puzner R, Urowitz MB, Gladman DD. Prolactin levels in systemic lupus erythematosus (abst). *Arthritis Rheum* 1992; 35: S239.
68. 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.
69. 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.

70. 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.
71. Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Cough J. Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; 21: 2064 - 2067.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leaños-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J Rheumatol* 1999; 26: 55 - 59.
76. Conconi MV, Walker AM. Chloroquine affects prolactin secretion and golgi morphology in the mammothroph. *Endocrinology* 1984; 114: 725 - 734.
77. Leaños-Miranda A, Blanco-Favela F. Autoanticuerpos anti-prolactina en lupus eritematoso sistémico: Frecuencia y correlación con la prolactinemia y actividad de la enfermedad. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas, UNAM (1998).
78. Garnier PE, Aubert ML, Kaplan SL, Grumbach MM. Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: decreased affinity of "big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 1273 -1281.
79. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 1026 - 1032.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

80. Soong YK, Ferguson KM, McGarrick G, Jeffcoate SL. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hyperprolactinemic serum. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 16: 259 - 265.
81. Larrea F, Escorza A, Granados J, et al. Familial occurrence of big-big prolactin as the predominant immunoreactive human prolactin species in blood. *Fertil Steril* 1987; 47: 956 - 963.
82. Tanaka T, Yano H, Umezawa S, et al. Heterogeneity of big-big hPRL in hyperprolactinemia. *Horm Metab Res* 1989; 21: 84 - 88.
83. Fraser IS, Lun ZG, Zhou JP, et al. Detailed assessment of big-big prolactin in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 585 - 592.
84. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi K. A normal ovulatory woman with hyperprolactinemia: presence of anti-prolactin autoantibody and the regulation of prolactin secretion. *Acta Endocrinol* 1992; 126: 497 - 500.
85. 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.
86. 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.
87. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 1026 - 1032.
88. Andersen AN, Pedersen H, Djursing H, Andersen BN, Friesen HG. Bioactivity of prolactin in a woman with an excess of large molecular size prolactin, persistent hyperprolactinemia and spontaneous conception. *Fertil Steril* 1982; 38: 625 - 628.

89. Whittaker MD, Klee GG, Kao PC, Randall RV, Heser DW. Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 826 - 830.
90. Rowe RC, Cowden EA, Faiman C, Friesen HG. Correlation of Nb2 bioassay and radioimmunoassay values for human serum prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 942 - 5.
91. 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 - 10.
92. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol* 1992; 37: 365 - 72.
93. Leños A, Pascoe D, Fraga A, Blanco-Favela F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus* 1998; 7: 398 - 403.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. Hirata Y, Ishizu H, Ouchi N. Insulin autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycemia. *J Jpn Diabetes Soc* 1970; 13: 312 - 320.
98. Folling I, Norman N. Hyperglycemia, hypoglycemia attacks, and production of anti-insulin antibodies without previous known immunization: Immunological and functional studies in a patient. *Diabetes* 1972; 21: 814 - 826.

99. Tanaka T, Shiu RPC, Gout PW, Beer ChT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1058 - 1063.
100. Tan EM, Cohen AS, Fries JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271 - 1277.
101. 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.
102. Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW. Detection of high molecular weight variant of prolactin in human plasma by a combination of electrophoretic and immunologic techniques. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 752 - 4.
103. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680 - 5.
104. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 76: 4350 - 6.
105. Berczi I. Prolactin, pregnancy and autoimmune disease. *J Rheumatol* 1993; 20: 1095 - 1100.
106. Cavaco B, Prazers S, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V. Hyperprolactinemia due to big big prolactin is differently detected by commercially available immunoassays. *J Endocrinol Invest* 1999; 22: 203 -208.
107. Leñós-Miranda A, Pascoe-Lira D, Blanco-Favela F. Prolactin and SLE (letter). *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1029 -1030.
108. 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.
109. Walker AM, Montgomery DW, Raraiya S, et al. Prolactin-immunoglobulin G complexes from human serum act as coestimulatory ligands causing proliferation of malignant B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1995; 92: 3278 - 3282.

110. McNeilly AS, Friesen HG. Presence of a nonlactogenic factor in human serum which synergistically enhances prolactin-stimulated growth of Nb2 rat lymphoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 408 – 411.
111. Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, et al. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Moll Cell Endocrinol* 1991; 80: 203 – 213.
112. Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 1988; 123: 1303 – 1306.
113. Cabrera V, Chape A, Rodriguez JC, Machado AJ, Larrea F. Differential effects of glycosylated and non-glycosylated porcine prolactin on estradiol and progesterone secretion by rat granulosa cells in culture. *Arch Med Res* 1998; 29: 13 – 19.
114. Price AE, Logvinenko KB, Higgins EA, Cole ES, Richards SM. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology* 1995; 136: 4827 – 4833.

## ANEXO 1

## 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<br>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<br>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, cetoacidosis ó desequilibrio electrolítico. ó<br>b) Psicosis. En la ausencia de drogas o alteraciones metabólicas conocidas.                                                                                                                                                        |
| 9. Alteración hematológica    | a) Anemia hemolítica, con reticulocitosis. ó<br>b) Leucopenia, menos de 4,000/mm <sup>3</sup> en dos o mas ocasiones. ó<br>c) Linfopenia, menos de 1,500/mm <sup>3</sup> en dos o mas ocasiones. ó<br>d) Trombocitopenia, menos de 100,000/mm <sup>3</sup> en la ausencia de causas secundarias a drogas.                                                                               |
| 10. Alteración inmunológica   | a) Células LE positivas. ó<br>b) Anti-DNA: Anticuerpos al DNA nativo en títulos anormales. ó<br>c) Anti-Sm: Presencia de anticuerpo al antígeno nuclear Sm. ó<br>d) Prueba serológica falsa positiva para la sífilis, positiva por lo menos durante 6 meses y confirmada por prueba de inmovilización al Treponema pallidum o por absorción con anticuerpos fluorescentes treponémicos. |
| 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 esta 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 2

# **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 está 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, incremento o disminución de la actividad psicomotora. Excluir causa metabólica, infecciosa y por drogas. |
| 8    | _____               | Trastornos visuales             | Cambios en retina de LES. Incluye cuerpos citoides, hemorragia retiniana, exudado seroso o hemorragia en las 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 lúpica                  | 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                      | Úlceración, gangrena, nódulos blandos digitales, infarto periungueal, 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 más 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    | _____               | Úlceras 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 límite 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 <sup>3</sup> , no debido a drogas.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1    | _____               | Leucopenia                      | Menor de 3,000 leucocitos por mm <sup>3</sup> , no debido a drogas.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

Calificación total del SLEDAI

## (ANEXO 3)

**CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON CONCAVALINA A**

Uno de los ligandos utilizados para la purificación de glicoproteínas es la lectina concanavalina A, aislada de la *Canavalia ensiformis* (frijol jack). Es una metaloproteína que contiene cuatro sitios de unión a metales. Las aplicaciones de esta columna incluye separación, purificación y caracterización de glicoproteínas.

Una columna de afinidad con la lectina Concanavalina A acoplada a sepharose de 1 mL (HiTrap Con A, Amersham Pharmacia Biotech), fue usada para separar la PRL no glicosilada y la PRL glicosilada. Cada columna tiene una capacidad de unión de 4 mg/mL del glicopéptido transferrina. Se aplicó a la columna la muestra a probar diluida con buffer de unión (20 mM TRIS-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM  $MnCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , pH 7.4) a un volumen final de 1 mL, y de inmediato se colectaron fracciones de 1 mL. Las primeras 10 fracciones se eluyeron con el mismo buffer de unión y las últimas 10 fracciones fueron eluidas con buffer de elución (20 mM TRIS-HCl, 0.5 M NaCl [pH 7.4], 0.5  $\alpha$ -metil-D-manosa. En cada una de las fracciones colectadas se les determinó la concentración de PRL por IRMA. Las columnas fueron regeneradas con 20 mM TRIS-HCl (pH 8.5) antes de correr una nueva muestra.

***Producción Científica Personal Publicada y Aceptada para Publicación  
Concerniente a la Línea de Investigación Sobre Prolactina y  
Autoanticuerpos Anti-Prolactina***

**Leaños-Miranda A**, Quintal-Alvarez G, Cervera-Castillo H, Blanco-Favela F. Prolactina como inmunomodulador. *Revista Alergia México* 1997; 44: 116 – 123.

**Leaños-Miranda A**, Bustos-López HH, Fraga-Mouret A, Blanco-Favela F, Pascoe-Lira D. Anticuerpos en contra de la prolactina en pacientes con lupus eritematoso sistémico e hiperprolactinemia. *Ginecol Obstet Mex* 1998; 66: 179 - 186.

**Leaños A**, Pascoe D, Fraga A, Blanco F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus* 1998; 7: 398 – 403.

**Leaños-Miranda A**, Pascoe-Lira D, Blanco-Favela F. Prolactin and systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1029 –1030.

Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, **Leaños-Miranda A**. Association between prolactin and disease activity in SLE. Influence of statistical power. *J Rheumatol* 1999; 26: 55 - 59.

Pascoe-Lira D, Duran-Reyes G, Contreras-Hernández I, Manuel-Apolinar L, Blanco-Favela F, **Leaños-Miranda A**. Frequency of macroprolactinemia due to autoantibodies against prolactin in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 924-929.

**Leaños-Miranda A**, Chávez-Rueda K, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasmatic clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press).

**Leaños-Miranda A**, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Detection of macroprolactinemia with the polyethylene glycol precipitation test in systemic lupus erythematosus patients with hyperprolactinemia. *Lupus* (in press).

**Leaños-Miranda A**, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to anti-prolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* (in press).

**Leaños-Miranda A**, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients: Frequency and correlation with prolactinemia and disease activity. *J Rheumatol* (in press).