



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PAPEL DE LA PROLACTINA EN EL PROCESO DE ACTIVACION DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO ACTIVO E INACTIVO



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA

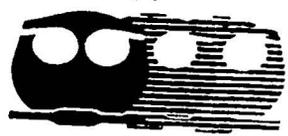
P R E S E N T A:

MARIA VICTORIA LEGORRETA HAQUET

TUTOR ACADÉMICO Dr. FRANCISCO BLANCO FAVELA

MEXICO, D. F.

2002



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**Jurado:**

Presidente	Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA
Vocal	Prof. JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ
Secretario	Prof. FRANCISCO BLANCO FAVELA
1er. sup.	Profa. ROSANA PELAYO CAMACHO
2do. sup.	Profa. MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Unidad de Investigación Médica en Inmunología  
Laboratorio de Autoinmunidad  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS  
Av. Cuauhtémoc 330, col. Doctores

**Asesor del tema:**

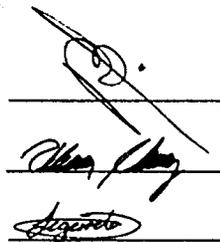
M en C. Francisco Blanco Favela

**Supervisor técnico:**

M en C. Adriana Karina Chávez Rueda

**Sustentante**

María Victoria Legorreta Haquet.



**AGRADEZCO SINCERAMENTE A:**

*A los H. Miembros del Jurado  
por sus valiosos comentarios.*

*Al Dr. Francisco Blanco Favela por su  
apoyo, su paciencia y por brindarme su  
amistad.*

*Mi especial agradecimiento a la M. en C. Karina  
Chávez Rueda por su paciencia, su apoyo en todo  
momento, sus consejos y sobre todo por su amistad.*

*A todo el personal del laboratorio de la Unidad de  
Investigación Médica en Inmunología del Hospital de  
Pediatria del CMN Siglo XXI, por el apoyo que  
siempre me brindaron.*

*A toda la gente que de una u  
otra forma tuvo que ver con la  
realización de éste trabajo.*

***DEDICO ESTE TRABAJO CON MUCHÍSIMO CARIÑO A:***

*A mis padres por su apoyo incondicional, su paciencia, amor, dedicación y confianza, sin los cuales nada de esto sería posible.*

*A mis hermanas por su comprensión su compañía y amistad.*

*A mi abuelita por todo el cariño y cuidados desde siempre.*

*A Gerardo Alvarado Cáramez por su amor y su apoyo.*

*A mis amigos por todo el apoyo, por esos gratos momentos, por sus consejos, pero sobre todo por su amistad incondicional.*

## **GLOSARIO**

<b>PBS</b>	<b>Solución salina amortiguadora de fosfatos</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina sérica bovina</b>
<b>ConA</b>	<b>Concanavalina A</b>
<b>PMA</b>	<b>12-miristato-13-acetato de forbol</b>
<b>cpm</b>	<b>Cuentas por minuto</b>
<b>RIA</b>	<b>Radioinmunoensayo</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>LES</b>	<b>Lupus eritematoso sistémico</b>
<b>SLEDAI</b>	<b>Índice de actividad del lupus eritematoso sistémico</b>
<b>ACR</b>	<b>American College of Rheumatology.</b>
<b>PRL</b>	<b>Prolactina</b>
<b>h-PRL</b>	<b>Prolactina humana</b>
<b>PRLR</b>	<b>Receptor de prolactina</b>
<b>HPRL</b>	<b>Hiperprolactinemia: niveles séricos de prolactina mayores a 20 ng/mL</b>

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Justificación</b>	<b>12</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>12</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>13</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>14</b>
<b>Esquema General de Trabajo</b>	<b>19</b>
<b>Resultados</b>	<b>20</b>
<b>Discusión</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>Apéndice</b>	<b>43</b>
<b>Tabla A</b>	<b>46</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>47</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>48</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>52</b>

## RESUMEN

### OBJETIVO:

Determinar la participación de la prolactina (PRL) en el proceso de activación de linfocitos provenientes de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) activo e inactivo, a través de la expresión de las moléculas de superficie CD69 y CD40L.

### MATERIAL Y METODOS:

Mediante gradiente de densidad se separaron células mononucleares (CMN) de sangre periférica provenientes de 12 personas sanas, 12 y 15 pacientes con LES inactivo y activo respectivamente. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, se colocaron  $2 \times 10^5$  cel/pozo en las siguientes condiciones: a) medio AIM-V, b) prolactina (50 ng/mL), c) mitógeno (ConA  $2 \mu\text{g/mL}$  para CD69 y PMA [5ng/mL]/Ionomicina [0.6  $\mu\text{g/mL}$ ] para CD40L), d) mitógeno más PRL y e) mitógeno más anticuerpo anti-PRL, como control de éste se utilizó un anticuerpo no relacionado. Las placas se incubaron durante 4 h para CD40L y 18h para CD69. Las células se cosecharon y marcaron con los anticuerpos anti CD40L, CD69 y CD4, y se analizaron por citometría de flujo.

### RESULTADOS:

La expresión de CD69 y CD40L no se modificó al incubar las células solamente con PRL. Con mitógeno, se encontró un aumento en la expresión de ambas moléculas en todos los casos, con respecto a las condiciones basales. El porcentaje de células CD4<sup>+</sup> que expresaron CD69 en sujetos sanos fue de 31.21%, en pacientes inactivos de 36.45% y en activos de 15.25%, y no se modificó cuando las células se co-incubaron con PRL, en sanos (32.1%), inactivos (33.17%) y activos (15.43%). En contraste, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de células que expresaron CD69 al agregar simultáneamente el anticuerpo anti-PRL: en sanos (15.49%), inactivos (19.54%) y activos (5.07%). La expresión de CD40L mantuvo un comportamiento similar, al estimular las CMN con mitógeno se observó aumento en el porcentaje de células que expresaron CD40L en sanos (56.04%), inactivos (44.57%) y activos (38.10%). Esta expresión no se modificó al co-incubar con PRL; en sanos (56.99%), inactivos (43.45%) y activos (35.72%). También se encontró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de células que expresaron CD40L al co-incubarlas con anticuerpo anti-PRL, en sanos (33.6%), inactivos (17.75%) y activos (9.72%).

A pesar de las diferencias en las expresiones de CD69 y CD40L entre activos e inactivos, al someter las células a nuestro modelo los tres grupos estudiados mostraron un comportamiento similar.

### CONCLUSIONES:

Confirmamos que la prolactina por si sola no tiene la capacidad de activar a los linfocitos provenientes de pacientes con LES. La PRL es secretada por los linfocitos y actúa de forma autócrina y desempeña un papel relevante en el proceso de activación medido por la expresión de CD69 y CD40L.

## INTRODUCCIÓN

### Prolactina:

La hormona lactogénica prolactina (PRL) es una hormona peptídica producida y secretada por la hipófisis anterior, su síntesis y secreción no está limitada a la pituitaria, existen numerosos sitios que la producen incluyendo: glándula mamaria, suprarrenales, corazón, hígado, bazo, y células del sistema inmune como los linfocitos T, B y NK (1-3).

La PRL es una proteína globular de una sola cadena de 199 aminoácidos (a.a.), con tres puentes disulfuro intra-moleculares entre seis residuos de cisteína (Cys 4-Cys 11, Cys 58-Cys 174, y Cys 191-Cys 199) (1-3), con un peso molecular de 23 kDa y de 25 kDa en la forma glicosilada, la cual presenta menor actividad biológica; esta forma ha sido encontrada en la hipófisis de una gran variedad de especies de mamíferos y aves. El grado de glicosilación varía entre las especies y los estados reproductivos (1-3).

Las diferentes isoformas de la PRL pueden resultar de: empalme alternativo de la transcripción primaria, proteólisis y otras modificaciones post-traduccionales de la cadena de aminoácidos. Estas incluyen la dimerización, polimerización, fosforilación, glicosilación, sulfonación, deamidación (2), o por la unión con otras proteínas como los anticuerpos (big big PRL 150 kDa) (5-7). Aunque también se ha descrito la isoforma de 16 kDa producto de la proteólisis (4).

La síntesis y secreción de PRL depende de un mecanismo de retroalimentación tónico rigido por la dopamina, corticosteroides, progestágenos, andrógenos, opiáceos y agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina. La secreción es estimulada por estrógenos, serotonina, hormona liberadora de la tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, antagonistas dopaminérgicos (clorpromazina metoclopramida, etc.), interleucina-1, embarazo, estimulación del pezón y estrés (1-3).

Se han documentado diferentes funciones biológicas de la prolactina que pueden ser divididas en categorías como: reproducción, homeostasis, crecimiento, osmoregulación, sinergismo con esteroides, etc. Aunque, algunos autores prefieren clasificarlas de acuerdo a los mecanismos de acción como (2):

- 1) Balance agua-electrolitos.
- 2) Desarrollo y crecimiento.
- 3) Endocrinología y metabolismo
- 4) Cerebro y comportamiento.
- 5) Reproducción.
- 6) Protección.

De acuerdo a sus características genéticas, estructurales y funcionales, la PRL pertenece a la misma familia de la hormona de crecimiento y lactógeno placentario. Los genes que codifican para estas hormonas provienen de un gen ancestral común. El gen de la PRL se encuentra localizado en el cromosoma 6 y contiene 16 kb, esta compuesto por 5 exones y 4 intrones (3). La expresión de este gen se ha confirmado en varias regiones del cerebro, miometrio, timo, bazo, médula ósea, linfocitos T y B, algunas líneas de células tumorales, etc. (3,8-10).

El receptor de prolactina (PRLR) es una proteína transmembranal que pertenece a la familia de receptores de citocinas hematopoyéticas, donde encontramos los receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, GM-CSF, GCSF, EPO y hormona del crecimiento (11,12). Esta compuesto por tres dominios, el extracelular con 210 a.a. involucrado en la activación del receptor por la dimerización secuencial inducida por su ligando, el transmembranal que posee 24 a.a. (su participación en el proceso de activación del PRL-R aún se desconoce) y el intracelular que tiene una importante participación en el mecanismo de iniciación de las señales de transducción asociadas con el receptor de PRL (2).

El gen que codifica para el receptor de prolactina en el humano se encuentra en el cromosoma 5, contiene por lo menos 10 exones y codifica para tres diferentes isoformas.

aparentemente como resultado de la transcripción iniciada en sitios alternativos de los diferentes promotores. Estas isoformas difieren en el tamaño y composición de la porción intracelular; exhibiendo un dominio extracelular idéntico, las tres isoformas se describieron en rata y son: la corta, (291 a.a.), la intermedia (393 a.a.) y la larga (591 a.a.) (3,13,14,15). La regulación transcripcional se establece por tres diferentes regiones promotoras tejido-específicas. El promotor I es específico de las gónadas, el promotor II de hígado y el promotor III es "genérico", está presente tanto en tejido gonadal como no gonadal (2,58).

El RNAm del receptor de PRL también se ha encontrado en numerosas partes del SNC, hipotálamo, corteza cerebral, bulbo olfativo, amígdalas, etc. Y en órganos periféricos como glándula pituitaria, corazón, pulmón, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, tracto intestinal, útero, músculo esquelético, piel, linfocitos T, B y macrófagos (2).

La PRL ha sido clasificada como una citocina que señala a través de receptores específicos de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores hematopoyéticos (1). La unión de PRL a su receptor induce la señalización mediante fosforilación de tirosinas (Tyr) en distintas proteínas intracelulares incluyendo al receptor. La región intracelular próxima a la membrana se encuentra constitutivamente asociada a JAK2 (3,16). Las proteínas de la familia de la señal transductora y activadora de la transcripción (Stat) son la principal señal transductora para el receptor de citocinas. JAK/Stat es la vía más importante en la iniciación de la activación del PRL-R, la familia de Stat esta constituida por ocho miembros, cuatro de ellos, Stat1, Stat3 y especialmente Stat5a y Stat5b, han sido identificadas como moléculas transductoras del PRL-R. Stat5 es reconocida como el transductor más importante de las isoformas larga e intermedia del receptor de prolactina (3,16).

La relación entre la prolactina y el sistema inmune se evidenció desde 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (17). Tiempo después Nagy y Berczi, publicaron su trabajo ya clásico donde la inmunodeficiencia característica de las ratas hipofisectomizadas se restituía al administrarles prolactina, hormona de crecimiento y/o lactógeno placentario (18). En 1983 se emularon estos

experimentos en una forma mucho más elegante, utilizando bromocriptina, la cual inhibe selectivamente la secreción de PRL, se encontraron resultados similares a los anteriores. Es decir, disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral (19). En la literatura se sugiere que la prolactina puede potenciar la respuesta inmune y la expresión de su receptor (RPRL). Recientemente han sido identificados receptores de PRL en células mononucleares (CMN) de sangre periférica, pudiendo entonces estar involucradas en el proceso de inmunidad mediado por células (1-3).

Se ha demostrado que la prolactina producida por los linfocitos presenta una bioactividad similar a la PRL pituitaria (2). La importancia de la prolactina en el mantenimiento de la inmuno-competencia ha sido demostrada en experimentos con animales, donde el tratamiento con PRL revierte la inmunosupresión inducida por hipofisectomía y restaura la inmunocompetencia en ratas de edad avanzada (20) Además, estudios *in vitro* mostraron que actúa como un factor de crecimiento para linfocitos (20). Actuando como co-mitógeno junto con la Concanavalina A en la estimulación de esplenocitos, timocitos y CMN. Además, induce la transcripción del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), el cual se encuentra relacionado con la diferenciación de linfocitos B y resistencia a virus (3,11).

El estado hiperprolactinéxico se ha asociado a múltiples enfermedades autoinmunes como tiroiditis, uveítis, hipofisitis linfocítica, insuficiencia renal autoinmune, y lupus eritematoso sistémico (LES) (21-23). Por otro lado se ha encontrado asociación entre los estados hiperprolactinéxicos sin enfermedad autoinmune, con la presencia de auto-anticuerpos. Mientras que las mujeres con normoprolactinemia no presentaron ningún auto-anticuerpo (24,25).

### **LES:**

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune no-órgano específica, se presenta a cualquier edad; aunque afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva con una relación de hombre-mujer de 1:10 (26-28). Este predominio en el sexo femenino ha sido atribuido a las propiedades inmuno-estimuladoras de las hormonas (27-29). LES

presenta además una tendencia a iniciar o presentar exacerbaciones durante el embarazo o en el post-parto, condiciones que se acompañan de niveles elevados de hormonas, entre ellas la prolactina. En la etiopatogenia de LES se encuentran involucrados factores genéticos, ambientales, infecciosos, inmunológicos y hormonales que desempeñan un papel importante en la regulación de la tolerancia inmunológica y en la formación de autoanticuerpos (27).

Los estudios realizados en familiares y gemelos idénticos sugieren predisposición genética, hasta un 12% de pacientes con LES tienen un pariente de primer grado con la misma enfermedad y existe mayor concordancia entre gemelos idénticos (60%) que en gemelos no idénticos (9%). Se ha reportado también asociación entre las moléculas de clase I y II del HLA y la enfermedad especialmente con B8, DR2 y DR-3 (30).

Entre los factores ambientales que pueden desencadenar la enfermedad destacan: la exposición a luz UV- $\beta$ , metales pesados, alimentos como semillas o germen de alfalfa, fármacos del tipo de procainamida, hidralaza, metildopa, clorpromazina, etc. (27). Los agentes infecciosos (virales y bacterianos) han sido relacionados con el desarrollo de autoinmunidad a través de mecanismos como mimetismo y/o reactividad cruzada que pueden dar lugar a una falla de la tolerancia inmunológica o a un estímulo anormal de la respuesta inmune (30).

Una de las características primordiales de LES es la activación inespecífica de linfocitos T y B que resulta en una producción exacerbada de auto-anticuerpos (31), por lo que el suero de estos pacientes muestra múltiples auto-anticuerpos dirigidos contra componentes celulares, citoplasmáticos y nucleares, entre los que se encuentran aquellos dirigidos contra dsDNA, ssDNA, RNA (33), ribonucleo-proteínas como Ro, La, Sm, RNP y antígenos de cito-esqueleto. Algunos de estos auto-anticuerpos como los anti-dsDNA y anti-SM, muestran una alta asociación con el LES, mientras que los anticuerpos anti-Ro están relacionados con el lupus cutáneo sub-agudo y lupus neonatal. Los anticuerpos anti-La en pacientes con lupus están usualmente presentes en aquellos con co-existencia de síndrome

de Sjögren (32,33). Otras anomalías serológicas incluyen hipo-complementemia, hiper-gamaglobulemia e inmunocomplejos circulantes (33,34).

La presencia excesiva de autoanticuerpos pudiera ser el reflejo de una falla en la tolerancia, lo que parece ser el punto central de la fisiopatología de LES (30). La asociación de LES con alelos de moléculas de MHC clase II y la maduración de la afinidad en la producción de auto-anticuerpos de clase IgG, sugiere que las células T juegan un papel importante en la patogénesis. Estudios adicionales indican que el bloqueo en el proceso de activación celular o en la interacción entre células T y B pueden prevenir la producción de autoanticuerpos y la enfermedad (26).

Las manifestaciones clínicas de LES involucran múltiples órganos y sistemas, por lo que éstas son extremadamente diversas y variables. Dentro de las características clínicas no específicas están: la fatiga excesiva, pérdida de peso, fiebre, anorexia y linfadenopatía.

En 1982 "The American College of Rheumatology" (ACR), estableció los criterios clínicos para el diagnóstico a fin de obtener una mejor clasificación de los pacientes con LES (35). El diagnóstico se establece si el paciente presenta al menos cuatro o más de los once criterios, con una sensibilidad de 98% y especificidad del 97%. Los criterios diagnósticos del ACR se encuentran en la tabla A. Cabe mencionar que el común denominador en esta enfermedad es una lesión tisular citológica caracterizada por el depósito de autoanticuerpos e inmuno-complejos en el tejido (34).

Desde hace más de 40 años se sabe que niveles bajos de complemento están asociados con la actividad en LES (34). Se ha demostrado que el complemento se fija por complejos inmunes localizados en los tejidos, particularmente en el riñón, la unión de los fragmentos C3a y C5a provoca la secreción de aminas vasoactivas de mastocitos, además la permeabilidad vascular puede incrementarse por fragmentos de C2, lo que permite la localización de complejos inmunes como causa de la inflamación aguda (34).

El evento central en la generación tanto de la respuesta inmune celular como humoral es la activación y expansión clonal de las células T. El proceso de activación de los linfocitos T es iniciado por la interacción del complejo TCR-CD3 con un péptido antigénico procesado y expresado en el contexto de la molécula de MHC clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA). Esta interacción de la célula T con el antígeno y la consiguiente activación de señales involucra también diversas moléculas accesorias de membrana tanto en la célula T como en la CPA. La interacción de la célula T con el antígeno desencadena una cascada de eventos bioquímicos capaces de iniciar el ciclo celular de los linfocitos (transición G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>). Las células T activadas progresan a través del ciclo celular, proliferando y diferenciándose en células de memoria o células efectoras (37).

Una de las primeras características que aparece en la población de células activadas es el cambio en el patrón de expresión de algunas moléculas de superficie. La sub unidad  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25), el receptor de transferrina (CD71), CD40L y CD69 son algunos ejemplos. A estas moléculas se les han denominado marcadores de activación celular (38). La expresión aberrante de algunas de estas moléculas probablemente está reflejando eventos que participan en la fisiopatología de LES (36). Diversos estudios indican que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES frecuentemente expresan niveles altos de moléculas accesorias como CD154 (CD40L), CD80, y CD86 en relación con los linfocitos de adultos sanos. El aumento en la expresión de CD80 o CD86 probablemente está contribuyendo en la presentación patológica de antígenos propios a las células T y/o a la producción patológica de autoanticuerpos anti-DNA (39).

CD154 (CD40L) es una proteína transmembranal de 30 KDa que pertenece a la familia del receptor de TNF, se expresa en la superficie de los linfocitos T activados. Su ligando es CD40 (molécula coestimuladora expresada constitucionalmente en CPA) (39).

La interacción CD40-CD40L induce una segunda señal esencial para el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, lo que inicia una cascada de eventos que resultan en la activación caracterizada por la expresión de una gran variedad de moléculas accesorias de superficie como CD80 y CD86 (39,40).

La información acerca de la expresión de CD40L en pacientes con LES es controversial. Existen reportes donde las CMN provenientes de pacientes con lupus activo presentan un aumento en la expresión de CD40L, lo que pudiera favorecer la expresión de moléculas inmuno-acesorias en células B, como las proteínas de la familia de B7 (CD80, CD86) que promueven la diferenciación de las células T interaccionando con su ligando CD28 (39,40). En contraste, otros autores han reportado que no existen cambios en la expresión de CD40L en pacientes con LES. Es más, la expresión de CD40L es baja durante la inactividad de la enfermedad y no se incrementa durante los periodos de actividad (36). A pesar de la información controversial se han realizado ensayos clínicos controlados donde tratan a los pacientes con LES con anticuerpos anti-CD154 (41-43).

La co-estimulación a través de CD40/CD40L regula la producción de IL-12 en células dendríticas y macrófagos, necesaria para el desarrollo de la respuesta Th1. Por otro lado el bloqueo de las interacciones CD40/CD40L desvía el patrón de citocinas hacia Th2. Fenómeno que en algunos animales de experimentación mejora las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades autoinmunes como la colitis. Además, la unión CD40/CD40L en monocitos es importante para la producción de IL-1a, IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8, así como para el rescate de los monocitos circulantes de la muerte por apoptosis. En macrófagos, la unión de CD40/CD40L se requiere para la producción de óxido nítrico e IL-12. Así mismo, las células NK que expresan CD40L lisan células blanco que expresan CD40 (44).

La expresión de CD69 en leucocitos se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad en pacientes con LES. (45). CD69 se expresa como un homodímero de 28 Kda formado por la unión de dos polipéptidos, es una proteína de membrana tipo II con un dominio C-tipo lectina, aparece a las pocas horas de activación, se presenta en diferentes células del sistema inmune. A CD69 se le ha denominado como una molécula inductora de activación (44). CD69 promueve el flujo de Ca<sup>2+</sup>, la síntesis de citosina y sus receptores, así como la inducción de la expresión de protooncogenes como c-myc y c-fos. Además participa en la promoción de lisis mediada por células NK (37). La información acerca de la expresión de CD69 en pacientes con LES es contradictoria, lo que probablemente manifiesta las anomalías inmuno-reguladoras observadas en estos pacientes (38).

Los ensayos clínicos acerca de la relación entre PRL y actividad del LES han sido contradictorios e inconsistentes, debido en parte al diseño de las pruebas, a los métodos estadísticos inadecuados y/o al bajo poder estadístico del estudio (46). Sin embargo, es consenso que niveles séricos altos de PRL se asocien con pacientes con LES (20,46). La frecuencia de hiperprolactinemia (HPRL) en pacientes con LES oscila entre 15.3% y 31%. En nuestro laboratorio encontramos una frecuencia del 15.8% en 259 pacientes con LES en donde la hiperprolactinemia correlacionó con la actividad de la enfermedad (5,6). En este mismo grupo se encontró que el 31.7% de los pacientes con HPRL presentaron anticuerpos anti-PRL, los cuales mostraron menor actividad en comparación con aquellos pacientes que no tuvieron este anticuerpo, sugiriendo que la actividad de la PRL fue atenuada por los anticuerpos (22,32). Esto fue apoyado por el seguimiento de una mujer embarazada con LES donde la persistencia de macroprolactinemia (big big PRL) se debió a la presencia de anticuerpos anti-PRL, observándose también una menor actividad probablemente por la presencia del anticuerpo. En contraste, la forma predominante en mujeres sanas y embarazadas es la PRL monomérica de 23 kDa. (47).

## JUSTIFICACIÓN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad reumática auto-immune que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva, aunque no existen datos estadísticos del LES en el IMSS, constituye gran parte de la consulta de reumatología. Sus manifestaciones clínicas van desde trastornos leves hasta ser una enfermedad mortal.

Los niveles séricos elevados de PRL se han asociado con la actividad de la enfermedad y la exacerbación de la misma, además del hecho de se ha demostrado que la PRL desempeña un papel importante en la respuesta inmune, así pues nos pareció interesante investigar el papel de la PRL en el proceso de activación de linfocitos provenientes de pacientes con lupus activo e inactivo en un modelo *in vitro*.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la respuesta inmune se ha encontrado que la PRL es esencial para que la IL-2 induzca proliferación en linfocitos T, estimula la expresión de receptores de IL-2, induce al factor 1 regulador de interferón, las propias células del sistema inmune producen y secretan PRL, además de expresar receptores para ella. En el LES se ha encontrado una asociación directa entre los niveles séricos de la PRL con la actividad de la enfermedad, hecho que se ha corroborado en modelos animales. Por lo anterior decidimos evaluar el papel de la PRL en el proceso de activación de linfocitos provenientes de pacientes con lupus activo e inactivo.

Los linfocitos provenientes de pacientes se sometieron a diferentes condiciones de PRL "*in vitro*" y se determinó la activación a través de la expresión de CD69 y CD154 bajo el espectro de las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es el papel de la prolactina en la activación de las células del sistema inmune provenientes de pacientes con LES?
- ¿Participa la prolactina en el proceso de activación de los linfocitos provenientes de los pacientes con lupus activo e inactivo?

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

- **HIPÓTESIS:**

1. Los linfocitos provenientes de pacientes con lupus activo expresarán un mayor grado de activación en comparación con los de pacientes inactivos e individuos sanos.
2. La prolactina favorece el proceso de activación de los linfocitos provenientes de pacientes con lupus (activo e inactivo), en contraste la PRL no favorece la activación de linfocitos de personas sanas.

- **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la participación de la prolactina en el proceso de activación de los linfocitos provenientes de pacientes con lupus eritematoso sistémico activo e inactivo a través de la expresión de las moléculas de superficie CD69 y CD40L.

- **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Evaluar la expresión de las moléculas de superficie CD69 y CD40L en linfocitos antes y después de someter a las células a nuestro modelo de estudio.
2. Analizar las diferencias en la expresión de CD69 y CD40L en el proceso de activación de los linfocitos provenientes de pacientes con lupus activo e inactivo.
3. Establecer la participación de la PRL en la expresión de CD69 y CD40L durante el proceso de activación de linfocitos provenientes de pacientes con LES.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

**Diseño:** Se trata de un diseño de tipo experimental.

**Pacientes:** Los 27 pacientes con lupus eritematoso sistémico fueron captados en los servicios de Reumatología de los Hospitales de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", de "La Raza" y del Hospital General de Zona No. 25. El diagnóstico se estableció solo cuando los pacientes presentaron 4 o más de los criterios del "ACR". Los controles fueron 12 personas sanas.

### **Criterios de inclusión:**

#### **-Pacientes con LES inactivo.**

- Pacientes de sexo femenino con diagnóstico de LES (que cubrieran al menos 4 de los 11 criterios del "ACR" para diagnóstico de LES a lo largo de su enfermedad).
- Edad (18 -51 años).
- Sin actividad, medida por SLEDAI (índice de actividad de lupus eritematoso sistémico), se consideró inactivo cuando se le otorgó una calificación igual a cero.
- Sin tratamiento con inmuno-supresores en los últimos 2 meses (azatrioprina, ciclofosfamida)
- Que aceptaron participar en el estudio donando sangre, solicitada mediante carta de consentimiento.

#### **-Pacientes con LES activo.**

- Paciente de sexo femenino con diagnóstico de LES de acuerdo a los criterios del "ACR".
- Edad (18 -51 años).
- Con actividad medida por SLEDAI, Se considero "Activos" cuando la calificación fue mayor de cuatro.
- Sin tratamiento con inmuno-supresores en los últimos 2 meses (azatrioprina, ciclosporina) y sin pulsos de metilprednisona y ciclofosfamida.

- Que aceptaron participar en el estudio donando sangre.
- Sin enfermedad infecciosa concomitante.

-Personas sanas.

- Edad (18 –51 años)
- Con niveles de prolactina menores o iguales a 20 ng/mL
- Que aceptaron participar en el estudio donando sangre.

#### **Criterios de exclusión:**

Todos aquellos pacientes cuyas células no fueron suficientes para cumplir con las expectativas de nuestro modelo.

#### **METODOLOGÍAS UTILIZADAS.**

##### **Determinación de PRL en suero:**

Se utilizó un kit comercial (RIA-gnost Prolactin) y conforme a las instrucciones del mismo, se procedió de la siguiente manera: Se agregaron 50 µL de suero o del estándar de prolactina en tubos sensibilizados con anticuerpo anti-PRL, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Los tubos se lavaron con 2 mL de regulador de lavado, se colocaron 100 µL de anticuerpo anti-PRL marcado con  $I^{125}$  y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente se lavaron y por último se leyeron en un contador de radiación gamma (Wallac/Wizard 1470).

##### **Separación de células:**

10 mL de sangre periférica fueron diluidos en PBS en una relación de 1:3, se agregaron 4 ml de Lymphoprep (NYCOMED) por cada 7 mL de sangre diluida. Se centrifugaron a 350 g/45 min. Las células mononucleares se colectaron de la interfase del gradiente, se lavaron dos veces con PBS y una vez con medio AIM-V (Gibco). La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul Tripan.

### **Proliferación celular:**

Las CMN fueron cultivadas en placas de 96 pozos, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en un ambiente con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 horas, probando diferentes concentraciones de mitógeno. 18 horas antes de cosechar, las células fueron marcadas con  $1 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-TdR}$  (Amersham), por pozo. Entonces las células se cosecharon sobre papel filtro (Whatman), utilizando un cosechador múltiple (cosechador de células 8 NUNC <sup>MR</sup>), el papel filtro se colocó en frascos con líquido de centelleo (Ecolumen) y se leyó en un contador beta de centelleo (Packard 1900TR).

### **Bioactividad de la PRL:**

Se evaluó la proliferación en células Nb2 (linfoma de rata) las cuales tienen la particularidad de proliferar en presencia de prolactina, hormona de crecimiento y lactógeno placentario. El rango de concentración hormonal capaz de producir estimulación está entre 60-500 pg/mL. Arriba de 1 ng/mL se produce una inhibición de la proliferación. Las células Nb2 se crecieron en medio de mantenimiento (medio Fisher complementado), 24 horas antes del bioensayo las células se colocaron en medio estacionario (medio Fisher, 10% SC, 1% SFB). Las células en confluencia se centrifugaron (1,200 rpm/10 min), y se resuspendieron en medio de bioensayo (medio Fisher, 10% SC) y se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL, en placas de 96 pozos en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior. Para la curva de PRL se colocaron concentraciones crecientes de hPRL (de 0 a 30 ng/mL). Las células Nb2 se incubaron durante 72 hrs y 6 hrs. antes de cosecharlas se marcaron con  $1 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-TdR}$ , se cosecharon y contaron en un contador beta. Se utilizó una curva estándar con concentraciones conocidas para determinar la concentración de nuestras muestras.

### **Identificación de CD69 y CD40L.**

Las CMN fueron cultivadas en placas de 96 pozos, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo, posteriormente se incubaron a  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  durante 18h para el caso de CD69 y 4h para CD40L bajo las siguientes condiciones a) medio b) prolactina (50ng/ml) c) mitógeno mas prolactina, d) mitógeno y e) mitógeno más anticuerpo anti-prolactina (elaborado en conejo). El anticuerpo anti-PRL se empleó diluido 1:50 en medio AIM-V.

Las células se cosecharon y se lavaron dos veces con 1 mL de PBS-BSA 0.2% Na<sub>3</sub>N 0.2%, se centrifugaron a 200 g/5 min, posteriormente fueron incubadas con diferentes anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo determinado. Todas las incubaciones se realizaron a 6°C/20 min. Las células se lavaron con 1ml. de PBS-BSA 0.2% Na<sub>3</sub>N 0.2% se quitó el sobrenadante y se fijaron con 35 µl. de PBS-p-formaldehído 1%. Por último las células se resuspendieron en 350 µl. de "Sheat Fluid" para su lectura en el citómetro (FACSCalibur Becton & Dickinson).

Los mitógenos utilizados fueron ConA para la determinación de CD69 y PMA+Ionomicina en el caso de CD40L.

Con el fin de utilizar la concentración óptima de cada uno de los anticuerpos, todos ellos fueron titulados.

El análisis de los datos se realizó en el programa WinMDI versión 2.8

#### **Análisis estadístico:**

Nuestros datos de activación celular en las diferentes condiciones de nuestro modelo de trabajo no presentaron una distribución normal de acuerdo con la prueba de normalidad realizada (Shapiro Wilk), por lo que la medida de resumen empleada fue mediana y cuartiles 25 y 75. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las variables entre los tres grupos de estudio, a fin de saber que grupos diferían se empleó la prueba de U de Mann-Whitney. Las diferencias intra-grupo se determinaron mediante la prueba de Wilcoxon. El nivel de significancia en todos los casos fue una  $p < 0.05$  para una hipótesis de 2 colas. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 10.0 para WINDOWS.

#### **REACTIVOS UTILIZADOS:**

##### **Mitógenos:**

- PMA (12-miristate-13-acetate de forbol). Se utilizó a una concentración de 5 ng/mL.

- Ionomicina. Se utilizó a una concentración de 0.6 $\mu$ g/mL
- ConA (Concanavalina). Se utilizó a una concentración de 2 $\mu$ g/mL

Todos los mitógenos fueron preparados en medio AIM-V enriquecido.

**Anticuerpos:**

- Control de Isotipo-FITC (BD PharMingen).
- Control de Isotipo-PE (BD PharMingen).
- $\alpha$ CD69-FITC (BD PharMingen).
- $\alpha$ CD4-PE (BD PharMingen).
- $\alpha$ CD40L-FITC (BD PharMingen).

**Anticuerpo anti-prolactina:**

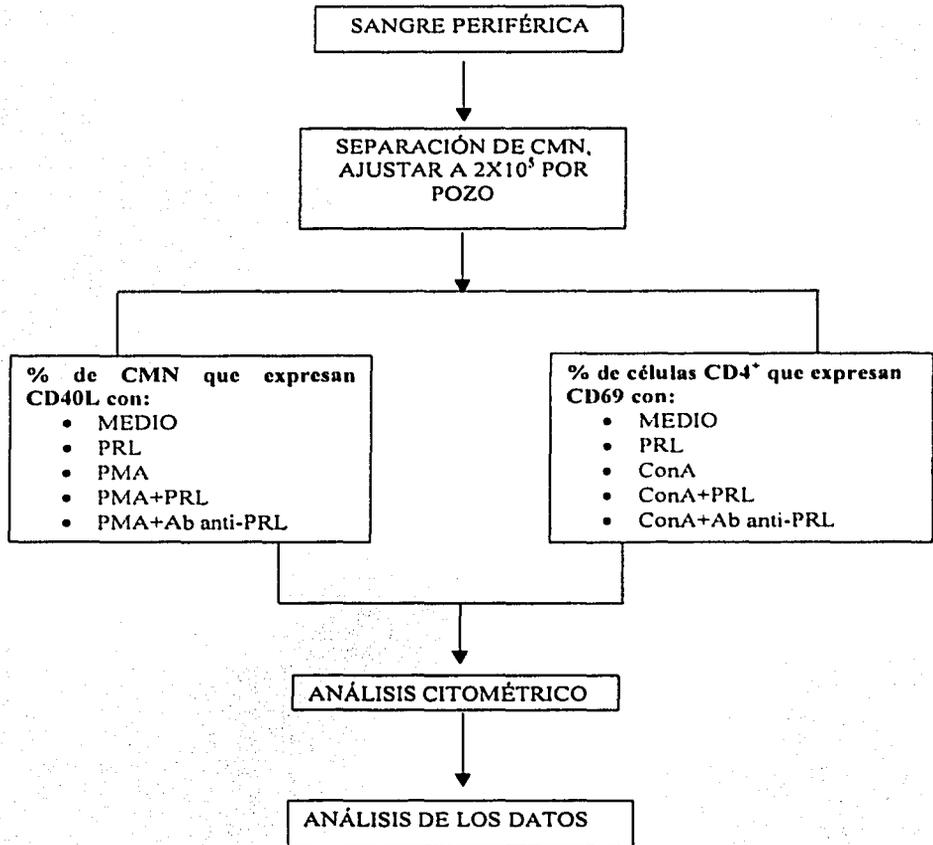
El anticuerpo anti prolactina humana se elaboró en la UIMI mediante inmunización de un conejo y se observó que no tiene reacción cruzada con hormona de crecimiento.

Como control de anticuerpo se utilizó suero normal de conejo.

**Prolactina:**

Prolactina pituitaria humana (NIDDK-hPRL-SIAFP-B3), la cual fue donada por el National Hormone & Pituitary Program.

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## RESULTADOS

Se estudiaron 39 mujeres con un promedio de edad de  $36 \pm 7$  años, divididas en tres grupos: como grupo control 12 mujeres sanas. Todas las pacientes con LES tuvieron al menos cuatro manifestaciones clínicas de los once criterios del "ACR", 12 de ellas fueron clasificadas como inactivas por que al momento de la toma de muestra presentaron valor de SLEDAI = 0. 15 fueron clasificadas como activas por tener valor de SLEDAI > 4 ( $X = 14 \pm 5$ ).

TABLA 1. Descripción de la población de estudio.

GRUPO	N	Edad promedio	TRATAMIENTO	% de pacientes bajo tratamiento	SLEDAI
1-SANOS	12	$31 \pm 10$	—————	—————	—————
2- LES INACTIVO	12	$43 \pm 8$	Prd $\leq 10$ mg/día	71.4	0
			Prd $\leq 10$ mg/día + Clrq 75-400 mg/día	28.6	
3- LES ACTIVO	15	$34 \pm 9$	Prd 10-60 mg/día	31.2	$14 \pm 5$
			Prd 25-60 mg/día + Clrq	43.7	
			50-150 mg/día S/t	18.0	

Prd = Prednisona, Clrq = Cloroquina, S/t = sin tratamiento.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los niveles séricos de prolactina de los controles y los pacientes con LES. Sin embargo, los pacientes con actividad lúpica mostraron niveles séricos más altos de PRL. incluso 25% de ellos presentaron hiperprolactinemia (figura 1).

La figura 2 muestra la estandarización de la concentración de ConA en el proceso de proliferación de CMN provenientes de personas sanas medido a través de incorporación de timidina [ $^3$ H-TdR]. Las mejores respuestas se encontraron en las concentraciones de 2 y 5  $\mu$ g/mL

## NIVELES DE PRL

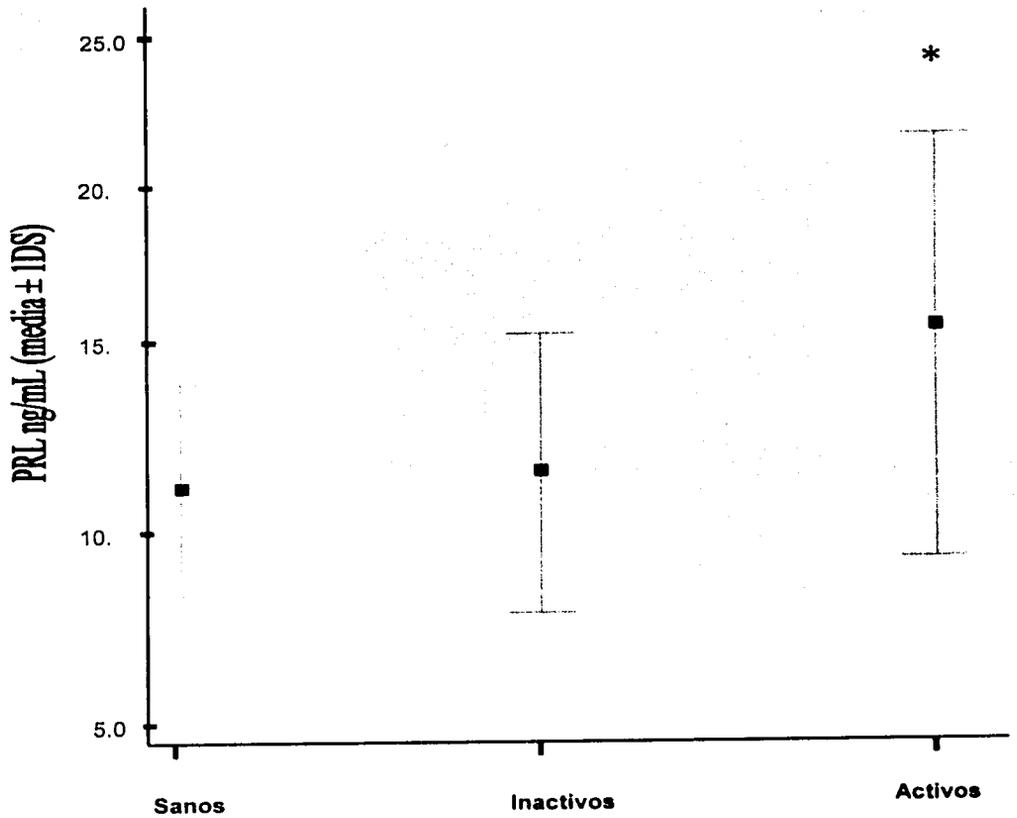
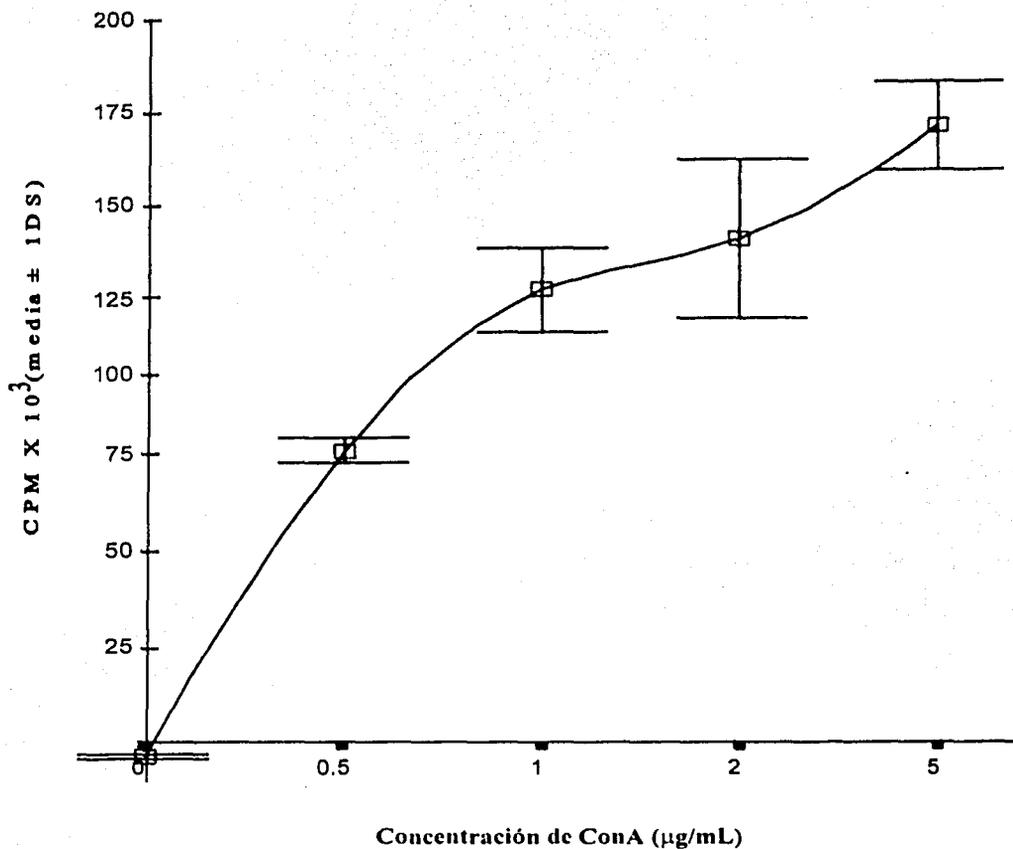


FIGURA 1 \*25% de los pacientes activos presentan hiperprolactinemia.



**FIGURA 2.** Proliferación celular medida a través de incorporación de [<sup>3</sup>H-TdR], a fin de establecer la concentración óptima de ConA (µg/mL). Se utilizaron CMN de sangre periférica a una concentración de 2X10<sup>5</sup> células por pozo. Los datos están representados como la media ± 1 SD.

Utilizando concentraciones similares a los ensayos de proliferación se determinó la activación a través de la expresión de CD69 en células TCD4<sup>+</sup> provenientes de personas sanas. Las CMN fueron estimuladas con ConA a 2 y 5 µg/mL (concentraciones óptimas según el ensayo de proliferación). Encontramos que a la concentración de 5 µg/mL la expresión de CD69 fue del 28.27 %. Sin embargo, se decidió utilizar 2µg/mL ya que las células presentaron mayor viabilidad (78.1%) en comparación con aquellas que fueron sometidas a 5 µg/mL (63.5%), Tabla 2.

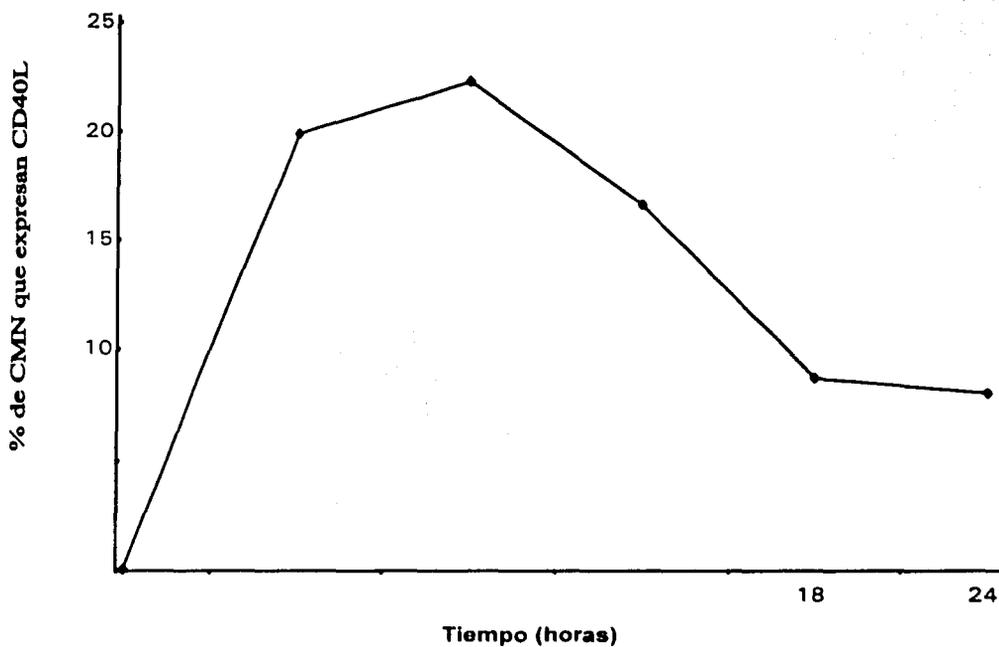
TABLA 2. Activación celular medida como porcentaje de expresión de CD69 en células TCD4<sup>+</sup> a fin de establecer la concentración óptima de ConA.

ConA (µg/mL)	% de células CD4 <sup>+</sup> que expresan CD69	Viabilidad (18h)
2	23.75	78.5
5	28.27	63.5

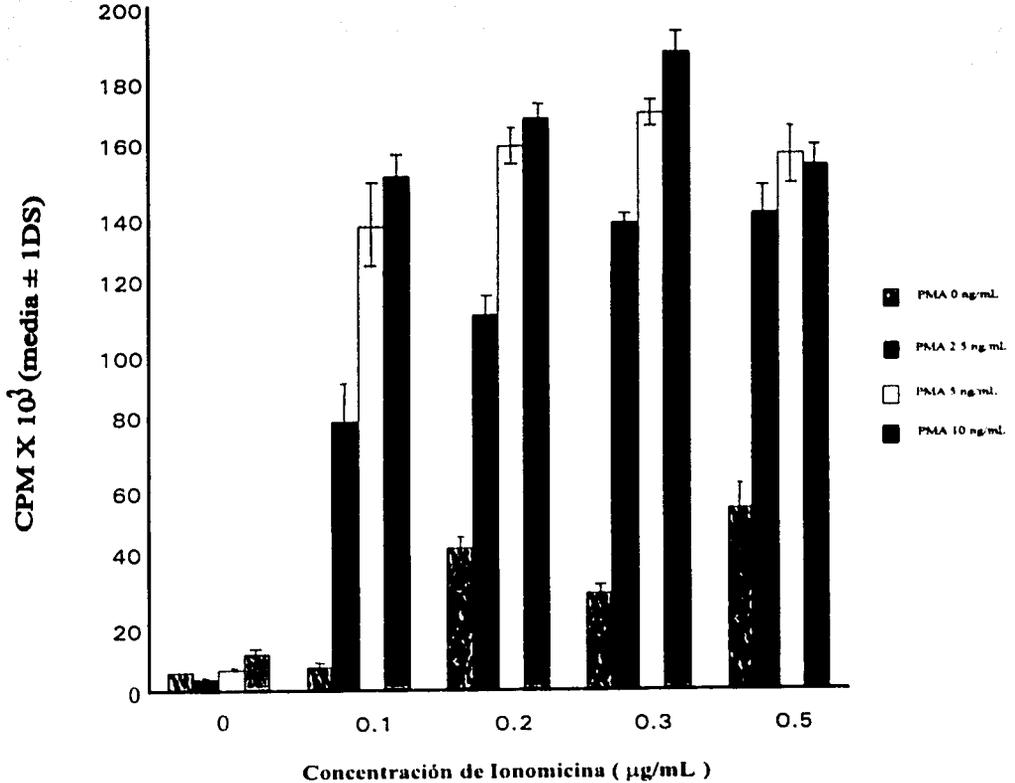
La figura 3 muestra la cinética de expresión de CD40L, donde se encontró que el tiempo óptimo de expresión de esta molécula fue entre 4 y 6 horas. Decidimos utilizar 4 horas por ser el tiempo más adecuado de acuerdo a los horarios de la recolección y el procesamiento de las muestras. Para CD69 no se realizó cinética de expresión ya que esta estandarización se estableció previamente en el laboratorio con un tiempo óptimo de 18 horas.

La figura 4; muestra los resultados de la estimulación con diferentes concentraciones de PMA/Ionomicina. Encontramos que la concentración adecuada de PMA fue de 5 ng/mL. Sin embargo, fue necesario establecer una segunda adecuación de la concentración de ionomicina por cambio de lote, este resultado se muestra en la figura 5, donde se puede observar el efecto de la estimulación con diferentes concentraciones de ionomicina.

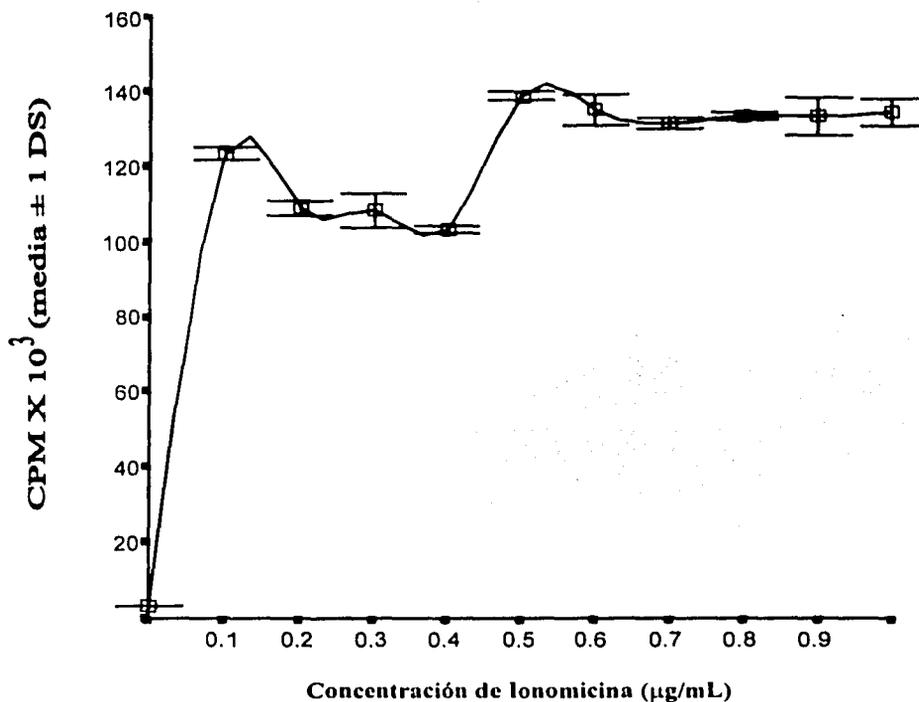
manteniendo constante la concentración de PMA en 5 ng/mL, obteniendo que a 0.5, 0.6 y 0.7  $\mu\text{g/mL}$  de ionomicina se observó la mayor proliferación celular.



**FIGURA 3.** Cinética de expresión de CD40L, el tiempo óptimo de expresión de CD154 fue de: 4-6 horas posteriores al estímulo. Se utilizaron CMN de sangre periférica de sujetos sanos a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo.

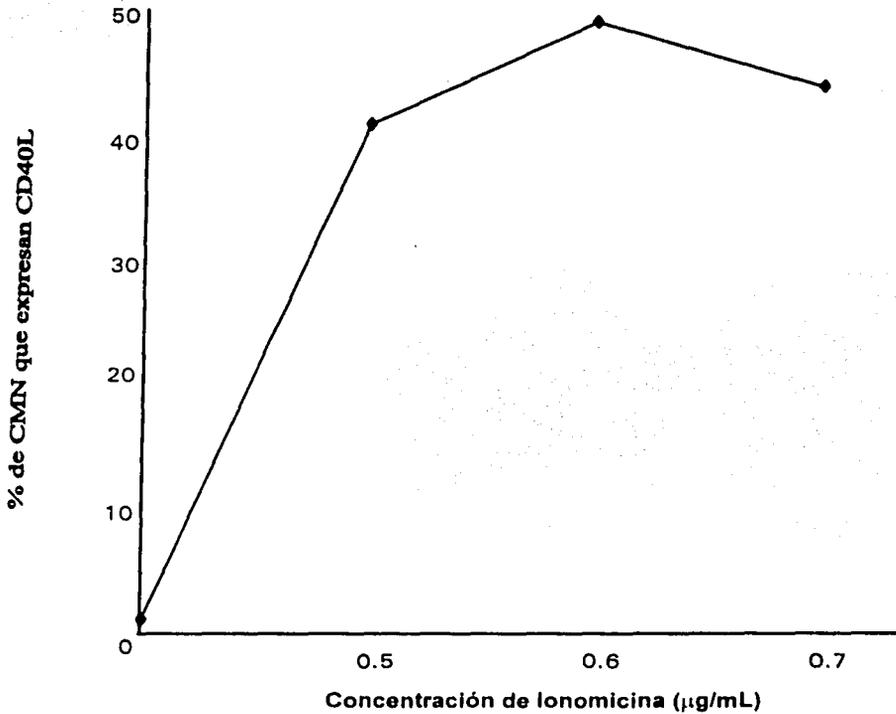


**FIGURA 4.** Proliferación celular medida a través de incorporación de [<sup>3</sup>H-TdR], a fin de establecer la dosis óptima de PMA (ng/mL)/Ionomicina (µg/mL). Se utilizaron CMN de sangre periférica a una concentración de 2X10<sup>5</sup> células por pozo. Los datos representan la media de las mediciones ± 1 SD.



**FIGURA 5.** Proliferación celular medida por incorporación de [<sup>3</sup>H-TdR] a fin de establecer la concentración óptima de PMA/Ionomicina, tomando como concentración base de PMA 5 ng/mL. Se utilizaron CMN de sangre periférica de individuos sanos, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo.

La figura 6 muestra la estandarización de la concentración ionomicina mediante un ensayo de activación celular, medida como por ciento de CMN que expresan CD40L. Se utilizaron las mismas concentraciones que en el ensayo de proliferación (0.5, 0.6, 0.7 µg/mL). Se mantuvo constante la concentración de PMA (5 ng/mL). La combinación óptima de PMA/Ionomicina es de 5 ng/mL y 0.6 µg/mL respectivamente.

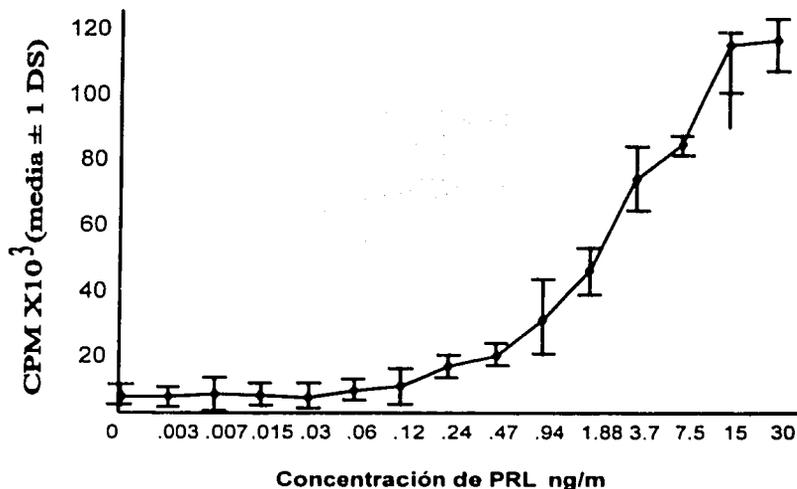


**FIGURA 6.** Activación celular medida por la expresión de CD40L (CD154) en respuesta al estímulo con diferentes concentraciones de mitógeno, con el fin de obtener la concentración óptima de PMA (ng/mL)/Ionomicina (µg/mL) tomando como concentración base 5 ng/mL de PMA. Se utilizaron CMN de sangre periférica de un individuo sano a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo.

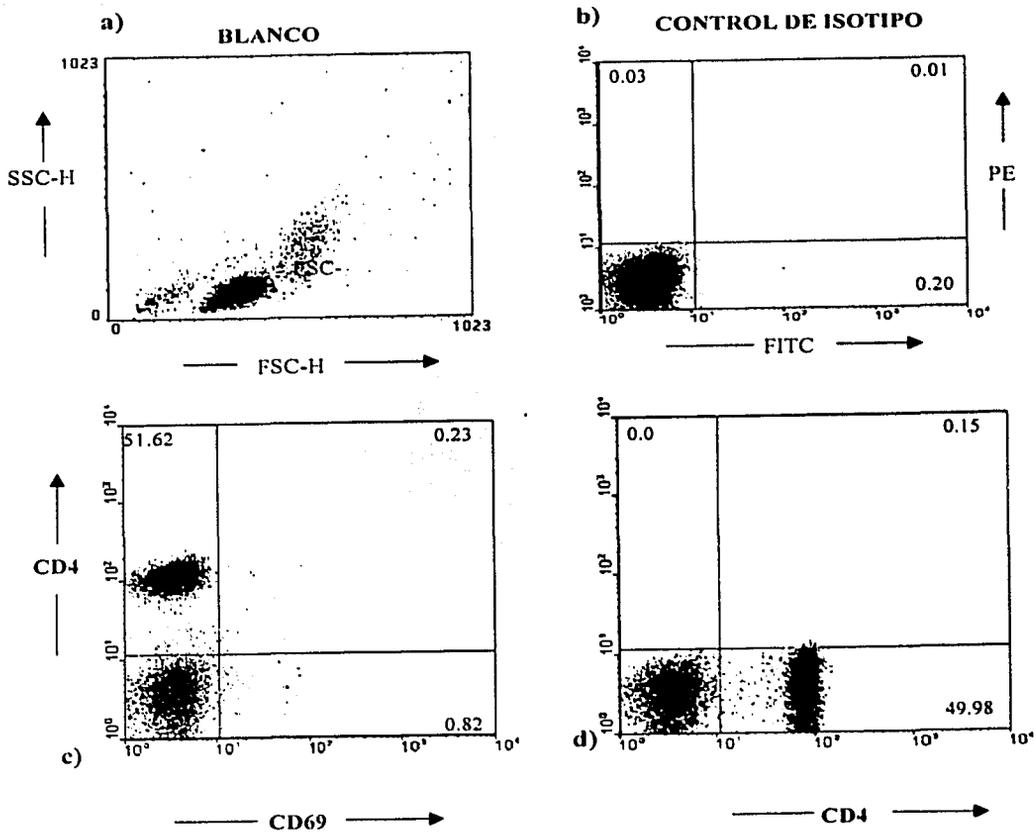
Con el fin de comprobar que la PRL utilizada en nuestro estudio es biológicamente activa se realizó un ensayo de proliferación utilizando células Nb2. La figura 7 muestra una curva dosis respuesta dependiente de la concentración de PRL.

La expresión de CD40L y CD69 en células provenientes de sujetos sanos, se analizó por citometría de flujo en tinciones simples y dobles respectivamente, a fin de establecer el porcentaje de células que expresan cada una de estas moléculas en respuesta a los diferentes estímulos propuestos en nuestro modelo.

La figura 8 ejemplifica la compensación electrónica del citómetro.

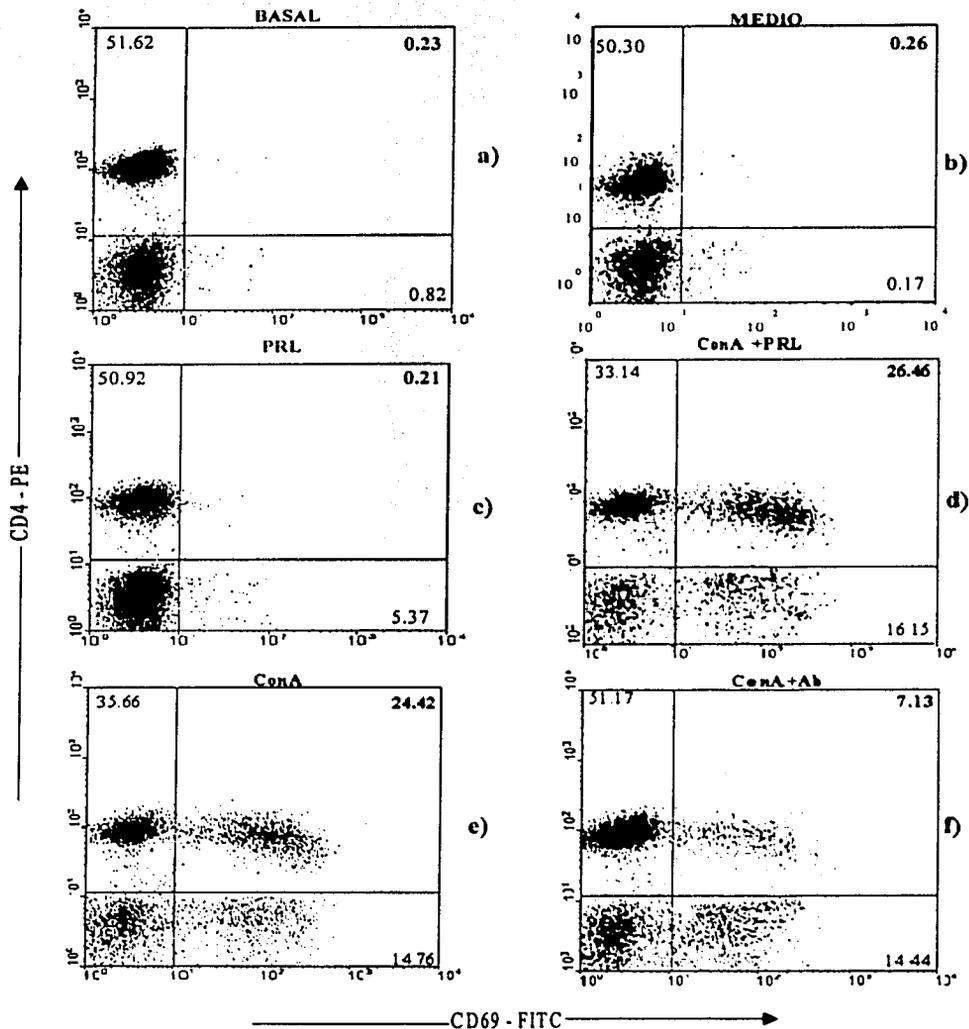


**FIGURA 7.** Bioensayo con células Nb2, la ordenada muestra incorporación de [<sup>3</sup>H-TdR]. Encontramos una curva dosis respuesta por prolactina humana. Se utilizaron células derivadas de linfoma (células T) de rata macho estrogenizado (células Nb2), a una concentración de 2X10<sup>5</sup> células por pozo. Los datos representan la media ± 1SD.



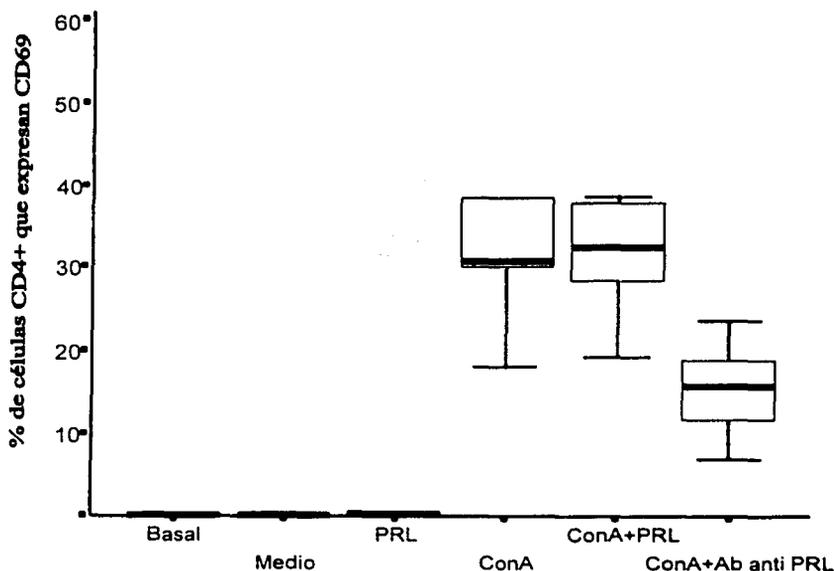
**FIGURA 8.** Compensación electrónica. (a) Blanco de células. (b) CMN de sangre periférica teñidas con un anticuerpo de especificidad irrelevante (c) Células teñidas con CD4-PE (FL-2). (d) Tinción con CD4-FITC (FL-1)

Un ejemplo del comportamiento en respuesta a los estímulos propuestos en nuestro modelo se puede observar en la figura 9.



**FIGURA 9.** % de linfocitos TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69. (a) Porcentaje de expresión de CD69 en estado basal, sin estímulo. (b) células incubadas durante 18 hrs. en medio, (c) células incubadas en presencia de PRL (50 ng/mL) (d) con ConA (2 µg/mL) en presencia de PRL (e) con ConA (2 µg/mL), (f) con ConA en presencia de anticuerpo anti-PRL (1:50).

Los datos fueron analizados individuo por individuo en el citómetro de flujo hasta completar cada uno de los grupos, se decidió presentar los datos como la mediana y cuartiles. Nuestro modelo mostró que en los linfocitos provenientes de sujetos sanos no hay diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69 en condiciones basales, al incubar con medio y con PRL. En contraste, la estimulación con ConA (2 µg/mL) incrementó el porcentaje de células que expresan CD69 a 31.21%, incremento que fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ), dicho aumento no se modifica al agregar PRL (50 ng/mL). La adición del anticuerpo anti-PRL (1:50) a las células estimuladas con ConA mostró una reducción en el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan la molécula CD69, éste decremento fue de aproximadamente 50% como se observa en la figura 10. Mientras con suero normal de conejo no encontramos disminución el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresaron CD69 (datos no mostrados).



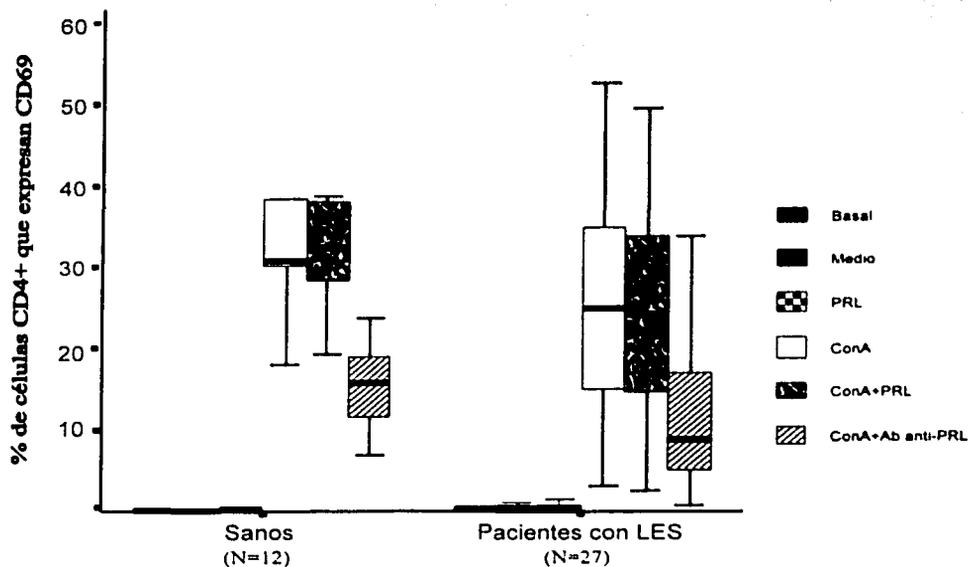
**FIGURA 10.** % de células CD4<sup>+</sup> que expresan CD69. CMN de sangre periférica de: voluntarios sanos. La figura representa el valor de la mediana ± los percentiles 25 y 75.

Al comparar las variables intra grupo, los pacientes con LES independientemente de la actividad de la enfermedad mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresaron CD69 en condiciones basales al compararlas con las células incubadas con medio. No hay diferencias entre las células estimuladas con mitógeno y mitógeno+PRL en ninguno de los casos. Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ), al comparar la respuesta a mitógeno contra los cultivos con medio solo. No se encontró efecto aditivo al agregar PRL al medio de cultivo, aunque, se mantuvo la diferencia observada con el mitógeno respecto a las condiciones basales y de medio de cultivo.

El anticuerpo anti-PRL bloquea la prolactina producida por las CMN provocando una disminución en el porcentaje de células que expresan CD69 respecto a la estimulación con ConA, reducción que fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

La comparación entre sujetos sanos y pacientes con LES agrupados independientemente del índice de actividad de la enfermedad, no mostró diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69 en ninguna de las condiciones evaluadas, aunque la frecuencia de células que expresaron CD69 en respuesta al mitógeno fue mayor en el grupo de sanos (35%) que en el de pacientes (28%).

La adición de PRL no mostró efecto aditivo. Sin embargo, mantuvo la diferencia observada con el mitógeno respecto al medio y al medio+PRL. En contraste, al agregar el anticuerpo anti-PRL disminuyó el porcentaje de células que expresaron CD69 en ambos grupos. Los valores están representados en la Figura 11.

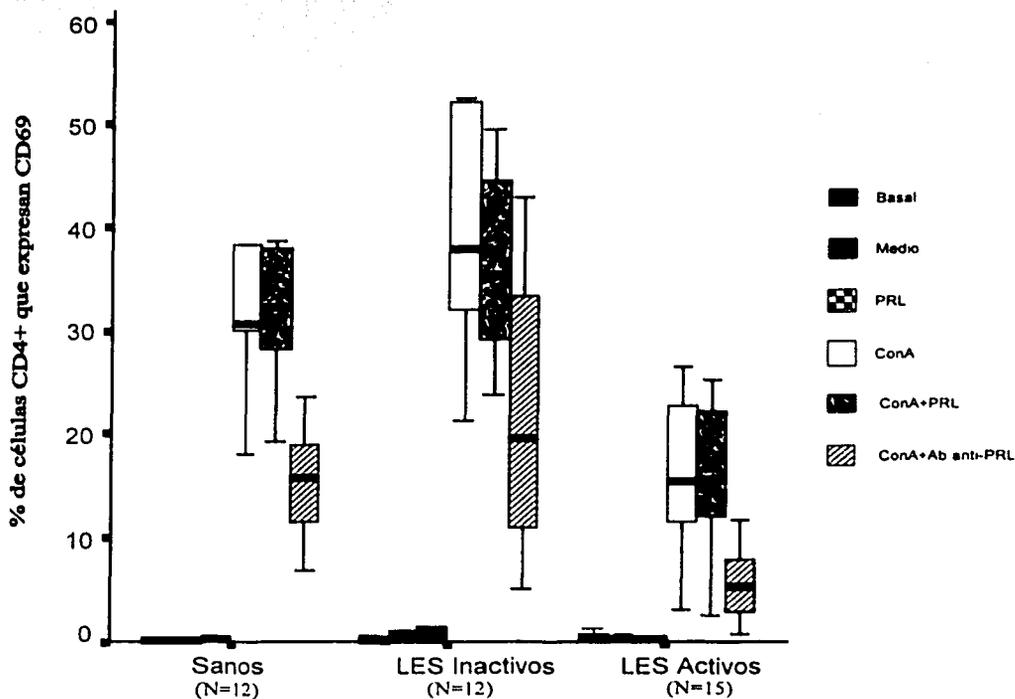


**FIGURA 11.** Activación celular medida como expresión de CD69 en linfocitos TCD4<sup>+</sup>. CMN de sangre periférica provenientes de: voluntarios sanos y pacientes con LES a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo, en las diferentes condiciones de nuestro modelo. Los valores están representados como la mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75.

Al comparar el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69 entre el grupo de sanos y los dos grupos de pacientes divididos de acuerdo a la actividad de la enfermedad, encontramos que ninguno de los grupos estudiados mostró diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69 al comparar las condiciones basales, de medio y medio+PRL entre sí.

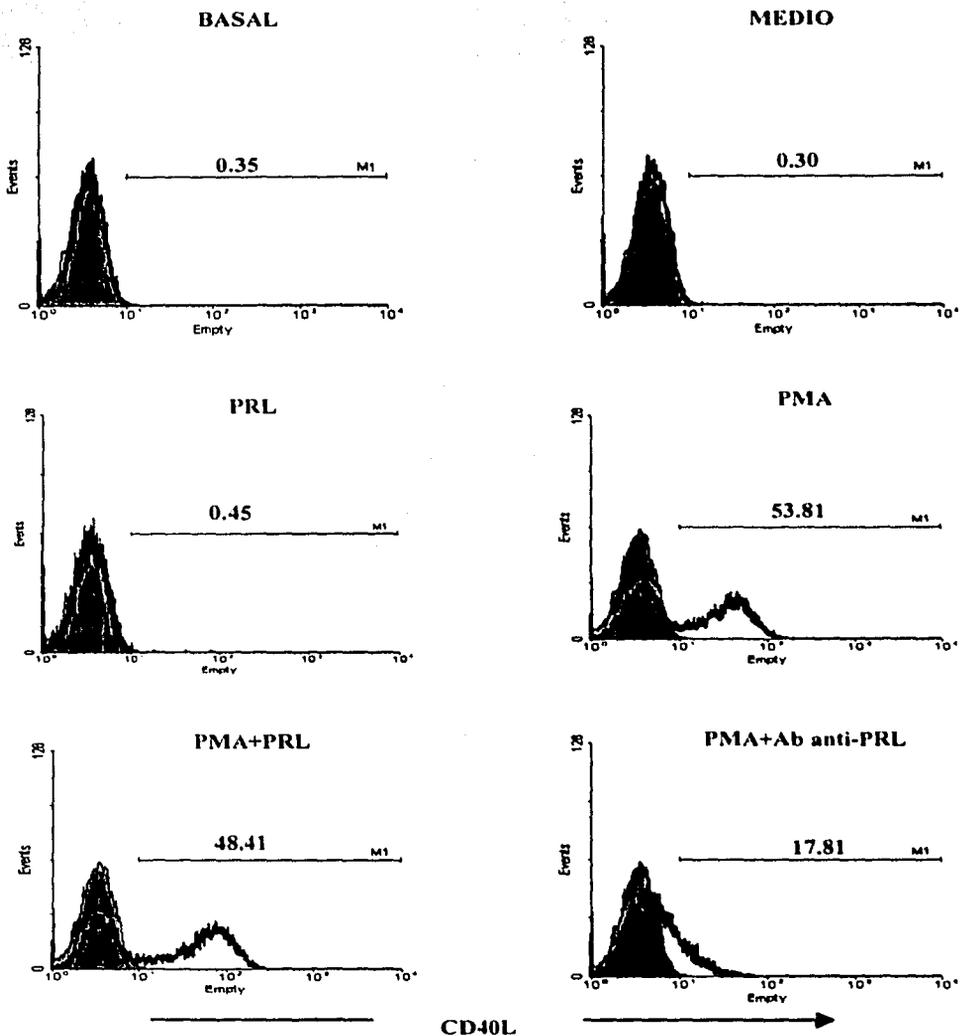
La respuesta a mitógeno fue menor y estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo de pacientes activos, no se encontró diferencia entre pacientes con LES inactivo e individuos sanos. La adición de PRL no generó ninguna modificación importante comparándola con la respuesta al mitógeno en ninguno de los grupos. En los tres grupos estudiados se observó

una clara disminución en el porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan CD69 al adicionar el anticuerpo anti-PRL (figura 12).



**FIGURA 12.** Linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan CD69: partiendo de CMN de sangre periférica provenientes de voluntarios sanos, pacientes con LES inactivo y activo, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo. Se muestra la mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75.

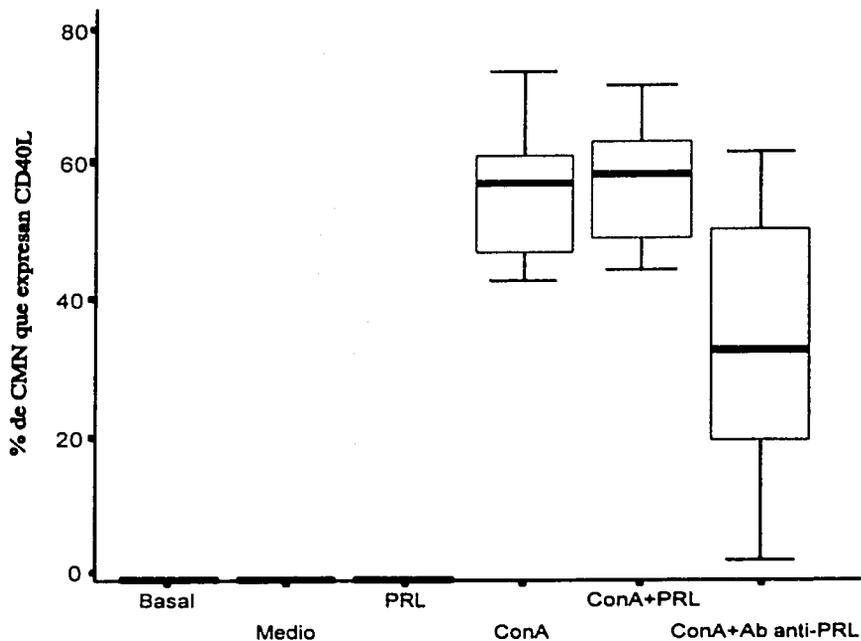
La figura 13 muestra un ejemplo del porcentaje de CMN que expresan CD40L en un individuo sano, en respuesta a los diferentes estímulos propuestos en nuestro modelo.



**FIGURA 13.** Porcentaje de CMN de sangre periférica que expresan CD40L (CD154). (a) Expresión de CD40L en estado basal, (b) células cultivadas durante 4 hrs en medio, (c) medio presencia de PRL (50 ng/mL), (d) con PMA (5ng/mL) + Ionomicina (0.6  $\mu$ g/mL), (e) con PM (5ng/mL) + Ionomicina (0.6  $\mu$ g/mL) + anticuerpo anti-PRL (1:50).

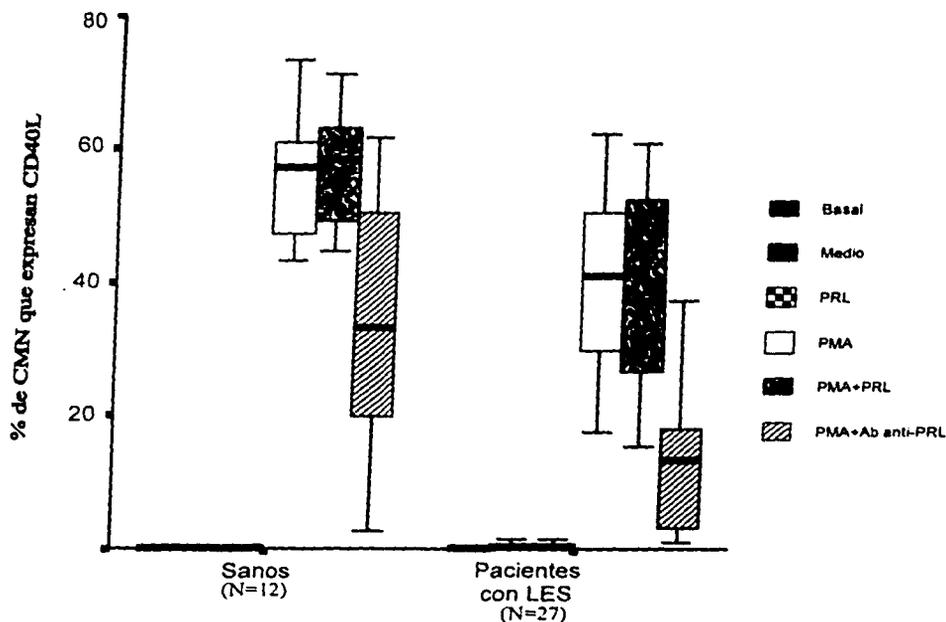
El porcentaje de CMN que expresaron CD40L mostró el mismo comportamiento que CD69 en el grupo de sanos como se puede apreciar en la figura 14.

La estimulación con PMA/Ionomicina incrementó el número de CMN que expresaron CD40L, incremento que fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) y éste no se modificó al agregar PRL (50 ng/mL). En contraste, la adición del anticuerpo anti-PRL (1:50) provocó una disminución de aproximadamente 35% de las CMN que expresaron CD40L. Mientras que el suero normal de conejo no altera el porcentaje de CMN que expresan CD40L.



**FIGURA 14.** Ensayo de activación celular medido como expresión de CD40L. Se muestra el % de CMN que expresan CD40L en voluntarios sanos, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo, sometiéndolas a las diferentes condiciones de nuestro modelo. La figura representa el valor de la mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75.

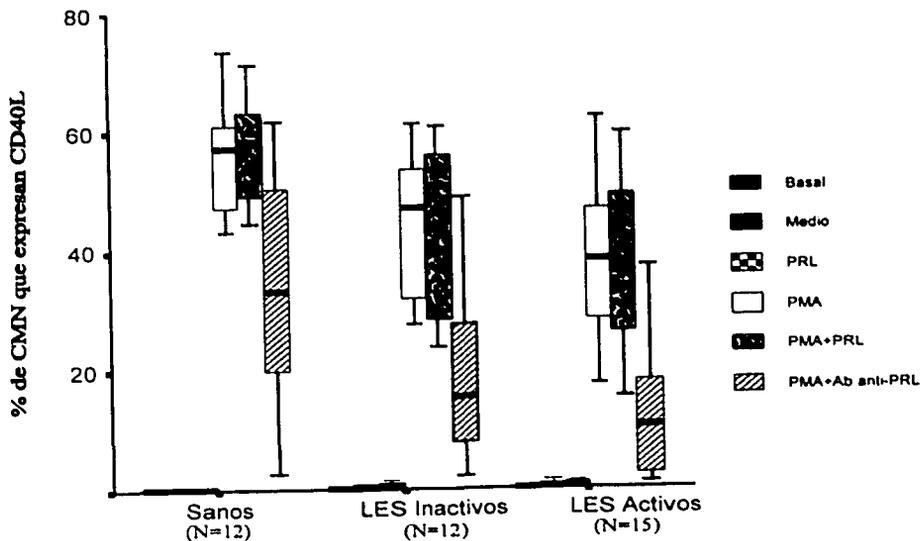
La Figura 15 muestra la comparación entre sanos y pacientes con LES agrupados independientemente del grado de actividad de la enfermedad. No se encontró diferencia en el porcentaje de CMN que expresan CD40L en condiciones basales para ninguno de los grupos. La estimulación con PMA/Ionomicina incremento significativamente el % de CMN que expresaron CD40L, siendo mayor el efecto en el grupo de sanos, dicho aumento no se altera al co-incubar las células con mitógeno más PRL. Sin embargo, con la adición del anticuerpo anti-PRL se encontró una reducción estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ), en el porcentaje de células que expresan CD40L de aproximadamente 42% en el grupo de sanos y 56% en el grupo de pacientes.



**FIGURA 15.** Porcentaje de CMN que expresan CD40L. Células provenientes de: voluntarios sanos y pacientes con LES, a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo, sometiéndolas a las diferentes condiciones de nuestro modelo. La figura representa la mediana  $\pm$  percentiles 25 y 75.

El porcentaje de CMN que expresaron CD40L no mostró diferencia en ninguna de las condiciones evaluadas entre pacientes activos e inactivos. En respuesta al mitógeno, se incrementó el porcentaje de células que expresan CD40L, encontrándose diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre sanos y pacientes activos, donde los sujetos sanos presentaron mejor índice de respuesta al mitógeno.

El porcentaje de células que expresaron CD40L al incubarlas con mitógeno más PRL fue estadísticamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en sujetos sanos que en enfermos (activos e inactivos). En todos los casos la adición del anticuerpo anti-PRL produjo una reducción del porcentaje de CMN que expresan CD40L: 40% en sanos, 51% en pacientes inactivos y 69% en activos (figura 16).



**FIGURA 16.** Ensayo de activación celular medido como porcentaje de CMN que expresan CD40L (CD154).

CMN de sangre periférica provenientes de: voluntarios sanos, pacientes con LES inactivo y activo a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo, en las diferentes

## DISCUSIÓN

La PRL fue identificada originalmente como una hormona neuroendócrina de origen pituitario, en la actualidad se sabe que es producida en numerosos sitios extrahipofisarios, estudios recientes han aportado evidencias que sugieren que la PRL tiene un papel importante en la respuesta inmune (48).

En modelos animales que padecen una enfermedad similar a LES, se ha demostrado que la PRL exacerba el curso de la enfermedad. En contraste, ratones tratados con bromocriptina muestran una presentación de la enfermedad más tardía, menos agresiva y con una mayor supervivencia (49). A pesar de esto los ensayos clínicos han sido controversiales e inconsistentes, algunos encuentran una correlación entre hiperprolactinemia y actividad de la enfermedad (46), mientras que otros no confirman esta asociación (50,54).

Se determinaron los niveles séricos de PRL de los individuos que formaron parte de éste estudio con la idea de caracterizar a nuestros pacientes, dado el tamaño de la muestra estudiada, éste resultado no es significativo para establecer una correlación clínica entre los niveles de PRL y la actividad de la enfermedad. Nosotros no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre los niveles séricos de prolactina y la actividad de la enfermedad en pacientes con LES. No obstante, encontramos una tendencia a niveles más altos de PRL en pacientes con mayor actividad de la enfermedad. Incluso 25% de los pacientes activos presentaron hiperprolactinemia (figura 1), lo que concuerda con resultados previos, en donde se ha reportado una frecuencia de hiperprolactinemia en pacientes con LES de entre 15-30% (32,46), correlacionando con la actividad de la enfermedad.

El delimitar las interacciones inmuno-reguladoras de las hormonas y sus mecanismos *in vivo* resulta esencial en la comprensión de la dicotomía sexual de las enfermedades autoinmunes y en las aplicaciones clínicas de la inmuno-modulación hormonal (51).

CD40L se expresa transitoriamente en células T y se une a CD40 en células B, transduciendo una segunda señal co-estimuladora. Esta señal es esencial para el crecimiento, diferenciación y generación de células B de memoria. Algunos estudios han reportado hiper-expresión de CD40L en los linfocitos T provenientes de pacientes con LES (52), reflejando la hiperactividad de las células T en las enfermedades autoinmunes (36,39). El incremento en los niveles de expresión de CD40L puede propiciar una prolongada o excesiva señalización vía CD40 promoviendo la activación de células T y B y la producción de autoanticuerpos (39).

Algunos autores afirman que la estimulación con anti-CD3 induce mayor expresión de CD40L en células T de pacientes con lupus en comparación con personas sanas, a pesar que la cinética de expresión de CD40L fue similar entre pacientes con LES y sujetos sanos cuando las células fueron estimuladas con PMA/Ionomicina (55). Estos últimos resultados concuerdan con los nuestros, ya que no encontramos diferencia estadística en la expresión de CD40L en condiciones basales, al incubarse con medio y medio+PRL en los tres grupos estudiados. La respuesta al mitógeno, sin embargo, fue claramente diferente a lo reportado por Desai-Mehta, ya que nuestros resultados muestran que las personas sanas expresan mucho más CD154 en respuesta a mitógeno que los pacientes con lupus. ¿Que tanto podría estar participando el tratamiento en el grupo de pacientes?. ¿O bien es parte de la fenomenología de la enfermedad?. Es difícil establecerlo. No obstante, estos resultados concuerdan con lo reportado por Bijil M. quien demuestra que no existen cambios en la expresión de CD40L en linfocitos de pacientes con LES (36). Es más, nosotros tampoco encontramos diferencia en la expresión de CD154 independientemente de la actividad de la enfermedad en ninguna de las condiciones estudiadas, sugiriendo efectivamente que la expresión de CD40L no se encuentra alterada en los pacientes con lupus. Es más, algunos autores afirman que la expresión de CD40L es baja cuando la enfermedad está inactiva y no se incrementa durante los periodos de actividad (36). Nuestros resultados junto con los ya mencionados incrementan la controversia en torno a la expresión de CD40L, ya que otros autores han encontrado correlación entre la expresión de esta molécula y la actividad de la enfermedad e incluso han iniciado tratamientos a nivel experimental bloqueando CD40L con anticuerpos humanizados anti-CD154 (41-43).

Por otro lado, la prolactina por si sola no ejerció ningún efecto en la expresión de CD154. Sin embargo, si concomitantemente a la activación de los linfocitos se bloquea la PRL con el anticuerpo anti-PRL encontramos una inhibición considerable en la expresión de este marcador de activación, sugiriendo que la prolactina producida por las células del sistema inmune es necesaria para la expresión de CD154 y su ausencia disminuye el porcentaje de células que expresan dicha molécula, sugiriendo que afecta directamente el proceso de activación celular. Además muestra que la PRL es producida por los linfocitos y actúa de forma autócrina.

En un reporte reciente la proporción de expresión de CD69/CD3 en células recién obtenidas de pacientes con lupus correlacionó con la actividad de la enfermedad (53). Nosotros, sin embargo, no encontramos cambios en la expresión de CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> obtenidos de los tres grupos estudiados. Es mas, los pacientes con lupus activo presentaron el mismo nivel de expresión de CD69 que los pacientes inactivos y las personas sanas. Al estimular las células *in vitro* en nuestro modelo observamos que los linfocitos de pacientes activos mostraron una expresión disminuida de CD69 en respuesta al mitógeno en comparación a los otros grupos, a pesar que dicha expresión debiera correlacionar con la actividad de la enfermedad (38, 53).

Nuestro modelo pretende determinar el papel de la PRL en el proceso de activación de los linfocitos provenientes de pacientes con lupus (activo o inactivo), utilizando como control la respuesta de un grupo de personas sanas a fin de establecer si la hiperprolactinemia que presentan los pacientes con lupus es un disparador de la actividad de la enfermedad; es por ello que se trató de simular un estado de hiperprolactinemia "*in vitro*". En nuestro modelo la prolactina agregada no ejerció ningún efecto por si sola en los linfocitos, cuando menos en la expresión CD69 en los tres grupos estudiados. En contraste, si en el proceso de activación de los linfocitos con mitógeno bloqueamos la PRL entonces encontramos una disminución considerable en el porcentaje de células que expresan CD69, indicando que: La PRL solo actúa una vez que se inicia el proceso de activación ya sea por un antígeno o un

mitógeno y que los linfocitos producen y secretan la PRL que participa en el proceso de activación independientemente de la que exista en el micro-ambiente.

## **CONCLUSIONES**

Confirmamos que la prolactina por si sola no tiene la capacidad de activar a los linfocitos de pacientes con LES, la PRL que participa en la respuesta inmune es secretada por los linfocitos actuando de forma autócrina, desempeña un papel relevante en el proceso de activación, especialmente en lo mecanismos de expresión de CD69 y CD40L y por resultados previos se sabe que presenta un efecto aditivo en la proliferación de los linfocitos T y B. Estos resultados podrían sugerir que dado que los linfocitos producen PRL una vez que son activados, pudiera ser que los estados hiperprolactinemicos de los pacientes con LES solo estén manifestando la activación inespecífica de los linfocitos de estos pacientes.



**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M ( ⊖ )**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	52.25g
Agua destilada	250mL

**REGULADOR DE FOSFATOS 1M ( ⊖ )**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	300mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	250mL

Mezclar los volúmenes (3:2) y ajustar el pH a 7.4 con la solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M restante

**PBS 10x: (NaCl 1.5M, FOSFATOS 0.1M) ( ⊖ )**

NaCl	87.66g
Regulador de fosfatos 1M	100 mL
Agua destilada	aforar a 1L

Pesar el NaCl y disolverlo en aproximadamente 800 mL de agua destilada, agregar 100 mL de Regulador de fosfatos, ajustar a pH 7.4 y aforar a 1L con agua destilada.

**PBS 1X ( ⊖ )**

Hacer una dilución 1:10 del PBS 10X con agua destilada. Ajustar el pH a 7.4

**PBS-BSA 0.2%-AZIDA DE SODIO 0.2% ( ⊖ )**

BSA	2 g
Na <sub>3</sub> N	2 g
PBS 1X	aforar a 1L

Pesar las sales y disolver en PBS 1X, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1L con el mismo PBS.

**PBS-p-FORMALDEHÍDO 1% ( ⊖ )**

p-FORMALDEHÍDO	1 g
PBS 1X	aforar 100mL

Calentar previamente el PBS hasta aproximadamente 56 °C, agregar el p-formaldehído, ajustar el pH a-7.4, y aforar a 100 mL

### **SHEAT FLUID 10X( ⊙ )**

NaCl	81.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23.5g
KCl	2.8g
EDTA Na <sub>2</sub>	3.6g
LiCl	4.3g
Agua destilada	aforar a 1L

**Pesar cada una de las sales, disolver en agua destilada y mezclar, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1L.**

**( ⊙ ) Todas las soluciones se filtran al vacío en membranas de 0.22 μ (msi micron separations inc).**

**TABLA A****Criterios de clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico**

1.-Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado sobre los pómulos.
2.-Eritema discoide	Placas elevadas de eritema con descamación queratósica adherente y taponamiento folicular, a veces, se observan cicatrices atróficas.
3.-Fotosensibilidad	
4.-Ulceras bucales	Ulceras bucales y nasofaríngeas observadas por el médico.
5.- Artritis	Artritis no erosiva con afectación de dos o más articulaciones periféricas, que se caracteriza por dolor.
6.-Serositis	Pleuritis o pericarditis documentada mediante ECG, roce o signos de derrame pericárdico.
7.-Alteraciones renales	Proteinuria mayor de 0.5g/día o de 3 + cilindros celulares.
8.-Alteraciones neurológicas	Convulsiones sin ninguna otra causa o psicosis o psicosis sin ninguna otra causa conocida.
9.-Trastornos hematológicos	Anemia hemolítica o leucopenia (menos de $4000/\text{mm}^3$ ), linfopenia (menos de $1500/\text{mm}^3$ ), o trombocitopenia (menos de $100000/\text{mm}^3$ ), después de descartar daño iatrogénico por medicamentos.
10.-Trastornos inmunológicos	Preparación positiva de la célula LE o anticuerpos anti- dsADN o anti-Sm o prueba VDRL falsamente positiva.
11.-Anticuerpos antinucleares	Título anormal de ANA mediante inmunofluorescencia o una técnica equivalente en cualquier momento, después de descartar daño por medicamentos que inducen ANA.

\*Si se observan cuatro de estos criterios, el diagnóstico de lupus sistémico se puede establecer con una especificidad del 98% y una sensibilidad del 97% en cualquier momento de la enfermedad.

## ANEXO 1

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION.

**Título del estudio de investigación:** Papel de la prolactina en el proceso de activación de linfocitos provenientes de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico activo e inactivo.

Este es un estudio sobre la prolactina y su relación con la enfermedad (lupus eritematoso sistémico) la prolactina es una hormona que se ha encontrado elevada en pacientes con lupus eritematosos sistémico.

El objetivo el estudio es: Estudiar el papel de la prolactina en la activación de los linfocitos a través de la expresión de moléculas de superficie en linfocitos de personas normales y pacientes con lupus activo e inactivo.

#### PROCEDIMIENTO

Este consiste en lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi enfermedad (historia clínica), que durarán aproximadamente 10 minutos.
2. Se revisará mi expediente clínico.
3. Aceptare donar sangre (10 ml aproximadamente) del brazo con una aguja, para hacer los análisis de prolactina y otros.

#### BENEFICIOS Y RIESGOS

Los resultados de la investigación se anexarán a su expediente para uso del médico tratante. La toma de muestra es la habitual para determinar hormonas en sangre (la aguja a veces produce una molestia que dura menos de un minuto, en ocasiones se produce un hematoma, pero ésto ocurre con muy poca frecuencia y no tiene complicaciones), no se harán otros procedimientos más que la toma de sangre, por lo que no presenta ningún riesgo.

#### CONFIDENCIALIDAD.

Los resultados de las pruebas de laboratorio se enviarán a mi médico tratante (a menos que yo manifieste lo contrario). Con excepción de esta revelación, toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada solo a efectos de la investigación, y en su caso para mi tratamiento.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

#### CONSENTIMIENTO.

Consiento en participar en este estudio, he recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo.

NOMBRE (firma) \_\_\_\_\_  
TESTIGO (firma) \_\_\_\_\_  
TESTIGO (firma) \_\_\_\_\_

**ANEXO 2**

**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**

NOMBRE: \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_  
 MATRICULA \_\_\_\_\_ CLINICA DE ADSCRIPCION \_\_\_\_\_  
 EDAD \_\_\_\_\_ AÑOS SEXO: FEMENINO ( ) MASCULINO ( )  
 DOMICILIO \_\_\_\_\_  
 TELEFONO \_\_\_\_\_ N° PROGRESIVO \_\_\_\_\_

MENARCA \_\_\_\_\_ AÑOS FUM \_\_\_\_\_ AÑOS RITMO \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ DIAS  
 GESTA \_\_\_\_\_ PARA \_\_\_\_\_ ABORTOS \_\_\_\_\_ CESAREAS \_\_\_\_\_  
 PLANIFICACION FAMILIAR: NO ( ) SI ( ) ESPECIFIQUE \_\_\_\_\_  
 EMBARAZO ACTUAL: NO ( ) SI ( ) SEMANAS DE EMBARAZO \_\_\_\_\_  
 LACTACION: NO ( ) SI ( ) TIEMPO \_\_\_\_\_

TIEMPO DE DIAGNOSTICO DE LES \_\_\_\_\_  
 CRITERIOS DE LA ENFERMEDAD QUE HA TENIDO:

1. ( ) ERITEMA MALAR TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 2. ( ) ERITEMA DISCOIDE TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 3. ( ) FOTSENSIBILIDAD TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 4. ( ) ULCERAS ORALES TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 5. ( ) ARTRITIS TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 6. ( ) SEROSITIS TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 PLEURITIS ( )  
 PERICARDITIS ( )

7. ( ) ALTERACION RENAL TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 BIOPSIA RENAL: NO ( ) SI ( ) FECHA \_\_\_\_\_ REPORTE \_\_\_\_\_

8. ( ) ALTERACION NEUROLOGICA TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 CONVULSION ( )  
 PSICOSIS ( )  
 EVC ( )

9. ( ) ALTERACION HEMATOLOGICA TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 ANEMIA HEMOLITICA ( )  
 LEUCOPENIA ( )  
 LINFOPENIA ( )  
 TROMBOCITOPENIA ( )

10. ( ) ALTERACION INMUNOLOGICA TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 CELULAS LE ( )  
 Ab ANTI-DNA ( ) TITULOS/TECNICA \_\_\_\_\_  
 Ab ANTI-Sm ( ) TITULOS/TECNICA \_\_\_\_\_  
 VDRL (falso positivo) ( )

11. ( ) ANTICUERPOS ANTINUCLEARES TIEMPO DE APARICION \_\_\_\_\_  
 TITULO/TECNICA \_\_\_\_\_  
 PATRON PERIFERICO ( ) PATRON MOTEADO FINO ( )

**OTROS DIAGNOSTICOS (sobrepuestos)**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_

**MEDICAMENTOS EMPLEADOS:**

- ( ) ANTES ESPECIFIQUE DOSIS \_\_\_\_\_  
TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) PREDNISONA DOSIS ACTUAL \_\_\_\_\_ mg/dia\* TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) CLOROQUINA DOSIS ACTUAL \_\_\_\_\_ mg/dia\* TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) METOTREXATE DOSIS ACTUAL \_\_\_\_\_ mg/dia\* TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) CICLOFOSFAMIDA DOSIS ACTUAL \_\_\_\_\_ mg/dia\* TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) AZOTIOPRINADO DOSIS ACTUAL \_\_\_\_\_ mg/dia\* TIEMPO DE TOMARLOS \_\_\_\_\_
- ( ) PULSOS DE METILPREDNISONA ACTUALMENTE ( ) ANTERIORMENTE ( )
- ( ) PULSOS DE CICLOFOSFAMIDA: ACTUALMENTE ( ) ANTERIORMENTE ( )

**\*En los últimos quince días**

**OTROS MEDICAMENTOS TOMADOS EN LOS ULTIMOS 15 DIAS:**

- |    |       |             |              |
|----|-------|-------------|--------------|
| 1. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 2. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 3. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 4. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 5. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 6. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 7. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 8. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |
| 9. | _____ | DOSIS _____ | MOTIVO _____ |

**COMENTARIOS** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**RESULTADOS DE LABORATORIO:**

<b>PRUEBA</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>PRUEBA</b>	<b>RESULTADO</b>
HEMOGLOBINA		HEMATOCRITO	
LEUCOCITOS		PLAQUETAS	
UREA		LINFOCITOS	
GLUCOSA		CREATININA	
GLOBULINAS		COLESTEROL	
PROTEINURIA / 24 h		DEP. DE CREATININA	
ERITROCITURIA x c		PROTEINURIA / TIRA	
CILINDRURIA		LEUCOCITARIA X c	
C4		C3	
ANA		ANTI-DNA	
PATRON DE ANA		ANTI-La	
ANTI-Ro		ANTI-Sm	
ANTI-RNP		IL-1	
IL-6		ESTROGENOS	
PROGESTERONA		TESTOSTERONA	
TSH		T3	
TE TOTAL		T4 LIBRE	
FSH		LH	
H CRECIMIENTO		PRL DIRECTA	
ANTI-CARDIOLIPINA		PRL TOTAL	
IgG			
IgM			
IgA			

**OBSERVACIONES**

---



---



---



---



---

## ANEXO 3

## INDICE DE LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES CON LUPUS

## SLEDAI

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

Peso	Calificación SLEDAI	DESCRIPCION	DEFINICIÓN
8	_____	Convulsión	Inicio reciente. Excluir causa metabólica, infecciosa o por drogas.
8	_____	Psicosis	Capacidad alterada en 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 del 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 de retina de L.F.S. Incluye cuerpos citoides, hemorragia retiniana, exudado seroso o hemorragia en la coroides o nefritis 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	Ulceración, gangrena, nódulos blandos digitales, infarto peritúngual, hemorragia 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 granulados o de eritrocitos.
4	_____	Hematuria	>5 eritrocitos por campo. Excluir infecciones u otras causas.
4	_____	Proteinuria	>0.5 g/24 h. Inicio reciente o incremento de más de 0.5 g/24h.
4	_____	Piuria	>5 leucocitos por campo. Excluir infecciones u otras causas.
2	_____	Eritema malar	Inicio reciente o recurrencia de eritema tipo inflamatorio.
2	_____	Alopecia	Inicio reciente o recurrencia de pérdida anormal de cabello.
2	_____	Úlceras en mucosas	Inicio reciente o recurrencia de ulceraciones orales o nasales.
2	_____	Pleuritis	Historia convincente de dolor pleurítico con frote, derrame o engrosamiento pleural.
2	_____	Pericarditis	Historia convincente de dolor pericárdico, 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 del laboratorio.
2	_____	Anticuerpo 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.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bouchard B, Ormandy C.J, Di Santo J.P, Kelly PA. Immune system development and function in prolactin-receptor-deficient mice. *J Immunol* 1999;163:576-582.
2. Marc E. Freeman, Béla Kanyicska, Anna Lerant and György Nagy. PRL *Phys Rev* 2000;80:1523-1631.
3. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998;19:3,225-268.
4. Montgomery, DW. Zukoski C.F. Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell HD. Concanavalin A stimulated murine esplenocytes produce a factor with prolactin like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem Bioph Res Co* 1987;145:2,692-698.
5. Leños-Miranda A, Pascoe D, Fraga A, Blanco-Favela. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus Erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus* 1998;7, 398-403.
6. Leños-Miranda A, Pascoe, D, Chavéz R.K, and Blanco-Favela. Antiprolactin autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus: Frecuency and correlation with Prolactinemia and Disease Activity. *J Rheumatol* 2001;28:1546-53.
7. Blanco-Favela F, Quintal MaG, Chavez-Rueda AK, Leños-Miranda A, Berron-Peres R, Baca-Ruiz V. Anti-prolactin autoantibodies in paediatric systemic lupus Erythematosus patients. *Lupus* 2001;10:803-808.
8. Maslar I A, Riddick DH Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:751-4.
9. Rosen S W Weintraub B D. Aaronson SA. Non -random ectopic protein production by malignant cells: direct evidence in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:834-41.
10. Di mattia GE, Gellersen B, Bonhet HG, Friesen HF. A human B lymphoblastoid cell line produce prolactin. *Endocrinology* 1988;122:2508-17.
11. Yuan L, Lee Y. Molecular Actions of prolactin in the Immune System P.S.E.B.M. 1997;251:35-52.
12. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulación* 1997;4:171-180.

13. Kelly PA, Djione J, Postel-Vinay MC, Edery M. The polactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235-251.
14. Goffin V, Kelly PA. The polactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997;2:1, 7-17.
15. Davis JA, Linzer DH. Expression of multiple forms of the Prolactin receptor. *Mol endocrinol* 1989;3:674-680.
16. Clevenger CV, Freier D O and Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cell of the immune system. *J Endocrinol* 1998;157:187-197.
17. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution o the tymus in the rat. *Anac Rec* 1930;47:119-129.
18. Nagy E, Berdzi I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 1978;89:530-537.
19. Nagy E, Berdzi I, et al. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 1983;6:231-243.
20. McMurray, R. Keisler, D. Kanuekel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol* 1991;147:3780-3787.
21. Walker SE, McMurray RW, Hourl JM, Allen SH, Keisler D, Sharp GC, Schlechte AJ. Effects of prolactin in stimulating disease activity in systemic lupus erythematosus. *Proc NY Acad Sci* 1998;840:762-772.
22. Dan P, Hartmann, John W. Holaday, et. al. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin *FASEB J* 1989;3:2194-2202.
23. Lavalle C, Loyo E, Paniagua R. Correlation study between prolactin and estrogens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987;14:268-272.
24. Buskila D, Berezin M. Autoantibody profile in the sere of women with Hiperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995;8:415-425.
25. Neidhart M Prolactin in autoimmune diseases. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217:408-4192.
26. Brian L Kotzin. Systemic Lupus Erythematosus. *Cell* 1996;85:303-306.
27. Dubois' Lupus erythematosus. Wallace J. Daniel, Hahn Hannahs Bevra. Lippincott Williams &Wilkins. 6a editon USA 2002 cap. 3-5,19.

28. Textbook of the Autoimmune disease. Lahita RG, Chiorazzi N, Reeves WH. Lippincott Williams&Wilkins. USA 2000.
29. Harrison's Principles of Internal Medicine 14Th edition 1998;1889-1893.
30. Martínez Elizondo P. Introducción a la Reumatología, 2ª Edición, 1997. SMR.
31. The mosaic of autoimmunity (The factors associated with autoimmune disease) Shoenfeld Y, Isenberg D. Elsevier 1989. Research monographs in immunology Vol.12 pp.135-148.
32. Leños-Miranda A. Autoanticuerpos anti-prolactina en lupus eritematoso sistémico: Frecuencia y correlación con la prolactinemia y actividad de la enfermedad. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas 1998. UNAM.
33. F. Blanco, J. Kalsi & D. A Isenberg. Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases. Clin. Exp. Immunol. 1991;86:66-70.
34. Morrow, J. Nelson, L Watts, R. Isenberg D. Autoimmune Rheumatic Disease, 2a Ed. 1999.
35. Tan EM, Cohen AS, Fries JF The 1982 revised criteria for the classification of Systemic lupus Erythematosus. Arthritis Rheum 1982;25:1271-1277.
36. Bijil, M. Horts, P. et al. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with SLE. Ann Rheum Dis 2001;60:523-526.
37. KUBY Immunology. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne. 4Ed. 2000.
38. Crispin, J.C. Martínez A, De Pablo P, Velasquillo C, and Alcocer-Varela J. Participation of the CD69 antigen in the T cell activation process of patients with SLE. Scand. J. Immunol 1998;48:196-200.
39. Rider, V. Jones, S. Evans M, Bassiri H, Afsar Z, Abdou N. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with SLE. J Rheumatol 2001;28:2644-9.
40. Kazunori K, Shogun-Santana E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kipps JT. The soluble CD40L (sCD154) in Systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1999;104:7,947-955.

41. Wang X, Huang W, Mihara M, Sinha J, Davidson A. Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40L in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2002;168:4,2046-53.
42. Davis JC Jr, Totoritis MC, Rosemberg J, Sklenar TA, Wofsy D. Phase I clinical trial of a monoclonal antibody against CD40-ligand (IDEC-131) in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:1,95-101.
43. Kalled SL, Cutler AH, Ferrant JL. Long-term anti-CD154 dosing in nephritic mice is required to maintain survival and inhibit mediators of renal fibrosis. *Lupus* 2001;10:9-22.
44. <http://www.encolimbia.com/medicina/alrgia9200moleculas2-vol4html>.
45. [http://www.ancell.com/html/anti-cd69\\_aim\\_2.html](http://www.ancell.com/html/anti-cd69_aim_2.html).
46. Blanco-Favela F, Quintal A.G. and Leañes M.A. Association between prolactin and disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. Influence of Statical Power. *J Rheumatol* 1999;26:55-9.
47. Leañes-Miranda A, Pascoe, L.D, Chavéz, R.K and Blanco, F Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with SLE. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2619-2624.
48. Prolactin, a pituitary hormone that modifies immune responses. Proceedings of the Mini-symposium on prolactin and SLE, held at the 5<sup>th</sup> International Conference on Systemic Lupus Erythematosus, Cancun, Mexico *Lupus* 1988;7:371-375.
49. McMurray RW, Keisler D, Kanuekel K, Izui S, Walker SE. Hiperprolactinemia in male NZB/NZW (B/W) F1 mice: accelerated autoimmune disease with normal circulating testosterone. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:338-43.
50. Buskila D, Margalit L, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with SLE. *J Rheumatol* 1996;23:629-632.
51. Elbourne K.B, Keisler D, and Mc Murray RW. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 1998;7:420-427.

52. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hiperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human Lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest.* 1996;97:2063-2073.
53. Su C-C, Shau W-Y. CD69 to CD3 ratio of peripheral blood mononuclear cells as a marker to monitor SLE disease activity. *Lupus* 1997;6:449-454.
54. Jimena, P, Aguirre, MA, Curbelo-López A, Andrés M, Courtay-García C, Cuadrado MJ. Prolactin levels in patients with SLE: a case controlled study. *Lupus* 1998;7:383-386.
55. Hu ZZ, Zhuang L, Meng J and Dufau ML. Transcriptional regulation of the generic promotor III of the rat Prolactin receptor gene by C/EBP beta Sp1. *J Biol Chem* 1998;273:26225-26235.