



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**“EFECTO DE LA PROLACTINA EN LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO MAYOR
DE HISTOCOMPATIBILIDAD II (MHC II) DE CÉLULAS DENDRITICAS DE
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)”**

**TESIS PRESENTADA POR:
DR. GAMALIEL BENÍTEZ ARVÍZU.**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS UNAM/IMSS**

**TUTOR
DR. LUIS JAVIER JARA QUEZADA.**

Facultad de Medicina



MÉXICO D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

Introducción.....	1
Justificación.....	3
Planteamiento del problema.....	4
Objetivos.....	5
Hipótesis.....	6
Metodología.....	7
Resultados.....	8
Análisis y Discusión.....	14
Conclusión.....	15
Aspectos Éticos, Recursos Financieros, Factibilidad y Cronograma.....	16
Bibliografía.....	17
Anexos.....	20

Introducción

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad auto-inmune caracterizada por la producción de auto-anticuerpos con manifestaciones pleomorfas y de etiología multifactorial.¹

La prevalencia se ha estimado entre 15 y 50 casos por cada 100,000 habitantes, dependiendo del país y la metodología utilizada para determinar esta²; en base a esta prevalencia se puede estimar que en el país existen entre 15,000 y 50,000 individuos con LES, principalmente del sexo femenino en una proporción es de 6 a 10 mujeres por cada hombre². Al ser en su mayoría mujeres jóvenes, no pocas ocasiones padecen dificultades de fecundidad y en la evolución del embarazo hasta su término³. Se ha adjudicado estas diferencias a factores hormonales en particular a la prolactina y estrógenos, ya que la elevación de los niveles plasmáticos de estas hormonas promueve la activación y supervivencia de células B autoreactivas⁴. En la última década diversos investigadores han reportado la asociación entre la Prolactina (PRL) y la actividad del LES, ya que cerca del 20-30% de los pacientes con lupus presentan hiperprolactinemia; estos niveles serológicos aumentados de PRL se asocian con mayor actividad por parte de la enfermedad⁵⁻¹⁰, subsecuentemente la disminución de la misma coincide con la disminución de la actividad de la enfermedad¹¹.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de 23 KD producida en la hipófisis anterior y en otros tejidos incluyendo células inmunes (linfocitos y monocitos), dicha molécula es idéntica en todas las fuentes. Sustancias como la IL-2 induce la síntesis de PRL en linfocitos asesinos activados (células LAK), mientras que los retinoides estimulan la expresión de PRL por parte de los linfocitos¹²⁻¹⁴. Dentro de los efectos fuera del tejido mamario se ha observado que *In Vitro* actúa como factor mitógeno necesario para la proliferación de linfocitos, basado en la producción de PRL y receptores para PRL en células progenitoras, siendo una citoquina hematopoyética que favorece la linfopoyesis de manera autocrina, dicho efecto solamente se presenta bajo condiciones de estrés y no en condiciones de homeostasis. Una función similar se observó en cultivos de líneas celulares de leucemia de linfocitos T¹⁴⁻¹⁷.

La PRL es capaz de inducir la diferenciación de mononucleares en combinación con factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) a células dendríticas¹⁸. Las células dendríticas (DC) son grupo de células heterogéneas encargadas de capturar, procesar y presentar diversos antígenos ante las diferentes variedades de linfocitos, efectos como la activación clonal de linfocitos vírgenes, coordinar el tipo de respuesta producida de acuerdo al perfil de citocinas; siendo el interferón gamma (IFN- γ) clave para la respuesta de la subpoblación de linfocitos T colaboradores 1 (Th1), la interleucina 4 (IL-4) para la respuesta de la sub-población de linfocitos T colaboradores 2 (Th2); y la interleucina 10 (IL-10) reguladora de la actividad de linfocitos. Las células dendríticas se pueden dividir en de acuerdo a su estirpe en células dendríticas mieloides (mDC) que incluyen a las células de Langerhans e intersticiales y las células dendríticas plasmocitoides (pDC), las cuales son localizadas en los órganos linfoides como el timo, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos.

Las células dendríticas de origen mielóide sufren un proceso de maduración que va de monocitos a célula dendrítica inmadura (CDi) y finalmente células dendríticas maduras. Las células dendríticas inmaduras poseen una gran capacidad fagocitaria y son importantes en el mantenimiento de la auto-tolerancia, una vez activadas por algún estímulo, maduran y migran a un ganglio linfático donde llevan a cabo su función de presentadoras de antígenos y coordinadoras de la respuesta inmune.¹⁹⁻²⁴

La producción *in Vitro* de IgG a partir de mononucleares de pacientes con LES estimulados con prolactina y la no producción en los controles sugieren una alteración en la fisiología inmunológica de estos pacientes relacionada con las acciones de la prolactina²⁵; estas acciones pueden evidenciarse en estudios donde la asociación de esta hormona con el GMCSF induce la maduración de DC inmaduras favoreciendo la presentación de antígenos por estas últimas^{18, 26}; otro efecto observado es el aumento en la expresión de CD69 y CD25 por parte de monocitos estimulados con prolactina (CD 69 glicoproteína marcador de superficie que indica activación celular, CD25 forma parte de la cadena alfa del receptor de IL-2) en mujeres sanas²⁷.

Al parecer la PRL realiza un efecto local debido a que las concentraciones en el plasma pueden permanecer

constantes y no todos los individuos con LES presentan hiperprolactinemia; estudios *in Vitro* ponen de manifiesto que las células del sistema inmune sintetizan PRL, esto aumenta su concentración localmente, favoreciendo la expansión clonal de linfocitos e inhibiendo la apoptosis de estos mismos, por medio de la activación de *abl-2*, *bcl-XL*, *pim-1* Y *XIAP* ^{16,28}. La vía de señalización de la PRL es JAK/STAT, donde STAT1 es necesaria para la activación de la producción de IFN- γ y STAT-5 necesaria para la síntesis de IL-2 ²⁹.

Análisis del gen de la prolactina, pone de manifiesto una sobre expresión de este en aquellos individuos con LES comparados con sus controles, lo que podría explicar la pérdida de homeostasis de producción de PRL en individuos con LES, lo que produce asociado a GM-CSF una mayor cantidad de DC que inducen la pérdida de auto-tolerancia periférica con la consecuente producción de linfocitos auto-reactivos que se ven favorecidos por la PRL productores de auto-anticuerpos causantes de la fisiopatología del LES ²⁸.

Observaciones recientes sugieren que la producción de PRL por la hipófisis en individuos con LES se ve disminuida en respuesta probablemente de la circulante producida por las células inmunes ³⁰. Existen diferentes tipos de prolactina (prolactina, *little* prolactina, *big-big* prolactina); que ponen de manifiesto que un incremento en la fracción libre de prolactina o de su fracción *little* se relacionan con actividad del LES ³¹, individuos con aumento en la *bigbig* prolactina han presentado una enfermedad sumamente activa ³².

Uno de los efectos más relevantes es la capacidad que tiene la PRL de inhibir la apoptosis inducida por esteroides ³³, lo que podría explicar en parte el por que la elevación de esta hormona se relaciona con actividad de LES, lo que explica los resultados en muchos ensayos realizados con células de individuos en control.

Recientemente se ha observado que las células dendríticas de individuos con LES presentan una sobre expresión de CD89 en comparación con individuos sanos, lo que sugiere una preactivación³⁴. A pesar de que se ha estudiado el efecto de la prolactina en las células dendríticas inmaduras en individuos sanos, este comportamiento no se a evaluado en individuos con LES.

Justificación

El LES es una enfermedad auto-inmune de etiología multifactorial y manifestaciones pleomorfas con una prevalencia estimada entre 15 a 50 casos por 100,000 individuos (variando de país a país) con una relación mujer / hombre de 6 a 10:1, con predominio en mujeres jóvenes en edad reproductiva ^{1, 2}. Se ha propuesto la participación de factores hormonales en la fisiopatología de este padecimiento basados en el predominio del sexo femenino ^{3, 4, 35}.

Observaciones por diversos autores han propuesto la relación entre la prolactina y LES, donde al parecer que niveles altos de prolactina sérica se relaciona con mayor actividad de la enfermedad ^{4-11, 32,33} estudios in Vitro han puesto de manifiesto la capacidad de producir auto-anticuerpos por acción de la prolactina²⁵ así como su efecto sobre las células dendríticas de individuos ^{25,26,33}

La prolactina hipofisiaria se produce ante diversos estímulos, tiene un efecto antagónico con los esteroides, actuando como una citocina pro inflamatoria, favoreciendo la activación y supervivencia de células del sistema inmune como las células dendríticas,³² las cuales son elementos claves en la respuesta inmunológica; la función de las células dendríticas es el procesamiento de distintos antígenos incluyendo los propios desde tejidos periféricos hasta su presentación a los linfocitos en los ganglios linfáticos ^{14, 18, 22, 23}. Estas células son susceptibles a la acción de diferentes citocinas ya que dependiendo del tipo de citocinas favorecerán una respuesta tipo Th determinada^{23, 24}. Siendo la prolactina una citocina con efecto sobre células efectoras del sistema inmunológico resulta preponderante observar si los efectos observados en individuos sanos sean los mismos que en individuos con LES; lo que explicaría en parte el efecto de la PRL en individuos con LES ^{36,38}.

La adecuada comprensión del eje neuro-endocrino-inmunológico se pone de manifiesto en esta entidad debido a los diversos efectos que presenta la prolactina sobre los monocitos y linfocitos, induciendo la producción de células dendríticas con presentación antigénica alterada y la consecuente pérdida en la auto tolerancia.

Planteamiento del Problema.

Los pacientes con LES presentan una actividad alterada en su inmunidad celular manifestada por pérdida de la auto tolerancia y producción de autoanticuerpos. Se ha observado que la prolactina juega un papel en esta pérdida de auto-reconocimiento, al verse alterada la función de las células dendríticas, favoreciendo la auto-inmunidad.

¿Es la prolactina un factor que aumente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) de las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de individuos con LES?

Objetivos

A) General:

Evaluar el efecto de la Prolactina en la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II de las Células Dendríticas inmaduras de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

B) Específicos:

- 1.-Medir la expresión de MHC-II de DCi de individuos con LES y sanos estimuladas con prolactina.
- 2.-Comparar la expresión de MHC-II de los cultivos de CDi de pacientes con LES con los individuos control.

Hipótesis:

“Las células CDi de individuos con LES y cultivadas con prolactina tiene una expresión MHC-II mayor que los individuos sanos.”

Metodología:

A.-Universo de trabajo:

Pacientes del servicio de Reumatología del Centro Medico Nacional “La Raza” con diagnostico de LES activo según la *American Rheumatology Asosociation*.

B.-Tipo de estudio

Experimento

C.-Descripción de variables.

C.1. Independientes:

C.1.1 Prolactina

Variable continua ng/mL.

C.2 Dependientes.

C.2.1 Expresión de moléculas de MHC-II.

Variable ordinal, expresada Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) por citometria de flujo.

E.-Selección de la muestra.

E.1 Todos los pacientes con diagnostico de LES activo que acepte la participación mediante consentimiento informado por escrito (ver anexo1), mayores de 18 años, con o sin tratamiento en el momento de la obtención de la muestra.

E.2 Grupos de estudio.

2 grupos de estudio:

A) Pacientes con LES.

B) Grupo control: individuos voluntarios disponentes sanguíneos del BCS.

E.1 Criterios de inclusión:

E.1.1 Todos aquellos pacientes con LES activo o inactivo sin tratamiento en el momento de obtención de la muestra.

E.1.2 Sin ningún padecimiento comorbido al momento de la toma de la muestra o ingesta de medicamentos para alguna de estas condiciones comorbidas.

E.1.3 Todo disponente sanguíneo que acepte participar en el estudio

E.1.4 Pacientes de los que se obtenga el consentimiento informado firmado

E.2 Criterios de exclusión:

E.2.1 Pacientes de los que no se obtenga el consentimiento informado para ingresar al estudio

E.2.2 Pacientes con cualquier tipo de inmunodeficiencia

E.3 Criterios de eliminación:

E.3.1 Complicaciones técnicas o logísticas que impidan obtener y/o procesar la muestra de las muestras de sangre venosa.

F.- Material y Métodos:

Se procedió a la obtención de sangre venosa de seis pacientes con LES en el servicio de reumatología

Se procedió a obtener sangre venosa de disponentes sanguíneos del BCS del CMN “La Raza” pareándolos de acuerdo a edad y sexo con los pacientes con EDTA como anticoagulante, se procedió a la obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de centrifugación con uso de *Ficoll-Paque*, se lavaron 3 veces con RPMI-1640 (*Gibco BRL, Gaithersburg, MD*) suplementado con 5mM de EDTA, y 2% de suero fetal bovino, se procedió a realizar selección positiva por medio de columnas magnéticas y anticuerpos anti-CD14+, posteriormente se adicionaron en cajas de cultivo a una concentración de 2x10⁶ por mL resuspendidas en 2 mL de suero RPMI [adicionado de insulina bovina (Libre de Na, Zn, 5µg/mL), holo transferina humana (5µg/ml) y selenito de sodio (5ng/mL).] GM-CSF (10ng/mL), IL-4 (10ng/mL) r-PRL (10-20-200ng/mL, como se indique) se adicionaran al inicio, al segundo y cuarto día; al día seis de haber sido sembradas se realizo citometria de flujo para medir expresión de MHC-II por parte de las CDi.

La evaluación de la formación de células dendríticas se llevo acabo por medio de la medición de expresión de CD14 y CD11c+ para medir la conversión de monocitos (CD14+, CD11-) a células dendríticas (CD14- CD11c+) por citometria de flujo. Posteriormente se midió la expresión de MHC II en las células DCi de los diferentes grupos por citometria de flujo y se compararon.

Resultados

Se estudiaron la expresión de las células de seis pacientes con LES y seis controles sanos; pareados por edad y sexo.

Los pacientes con LES activo fueron dos femeninos de 19 y 42 años respectivamente y un hombre de 31 años.

Los paciente con LES inactivo fueron femeninos de 37, 55, 41 años respectivamente.

Los controles se parearon por edad y sexo.

El promedio de CDi en el medio de cultivo al día de la cosecha fue de 90%.

La Intensidad Media de Fluorescencia promedio se observa en el cuadro 1 y grafica 1.

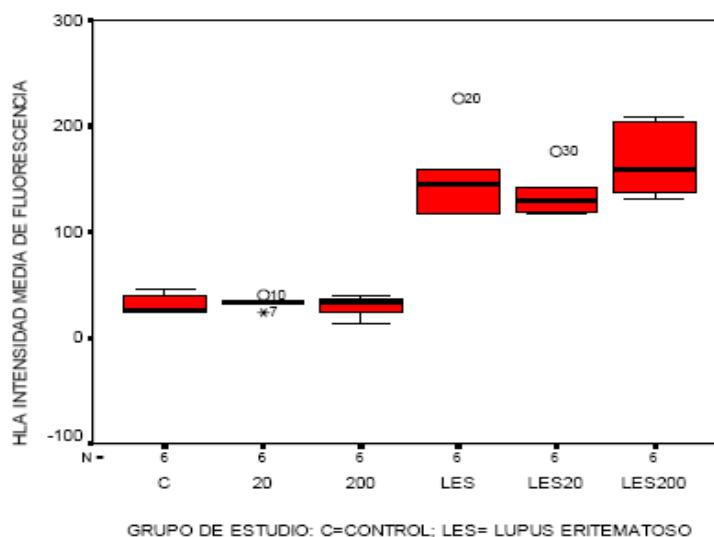
La intensidad media de fluorescencia entre los controles se observa en la grafica 2 y la de los pacientes con LES en la grafica 3.

Cuadro1
**Expresión de Intensidad Media de Fluorescencia del Complejo Mayor de
 Histocompatibilidad II de Individuos Sanos y con LES a diferentes concentraciones de
 PRL (0, 20,200ng/mL)
 HLAIMF**

Condicion	Promedio	N	Std. Deviation
Control sin PRL	31.0800	6	9.0540
Control 20ng PRL	33.5733	6	5.3616
Control 200ng PRL	30.8167	6	9.6081
LES sin PRL	152.0600	6	40.0207
LES 20ng PRL	135.6167	6	21.9987
LES 200ng PRL	166.9917	6	33.5012
Total	91.6897	36	65.2603

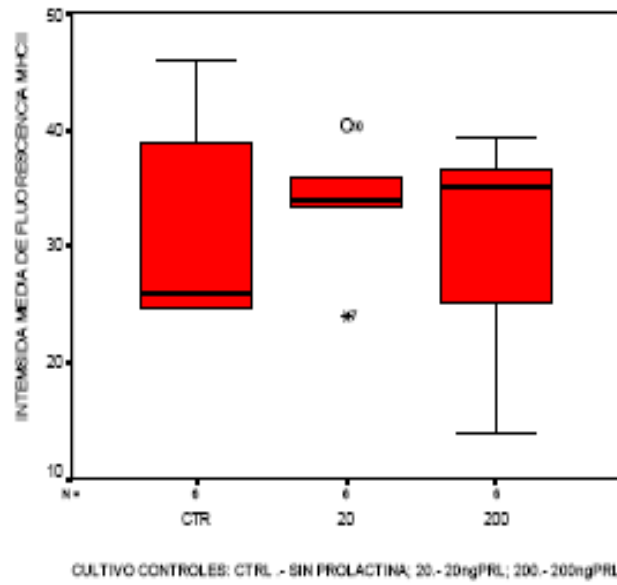
**Grafica 1:
 Expresión Media de Fluorescencia por grupo.**

(C = CONTROL, 20 = CONTROL + 20ng PRL, 200 = CONTROL + 200ng PRL,
 LES = LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO, LES20 = LUPUS ERITEMATOSO
 SISTEMICO + 20ng PRL, LES200 = LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO + 200 ng
 PRL)

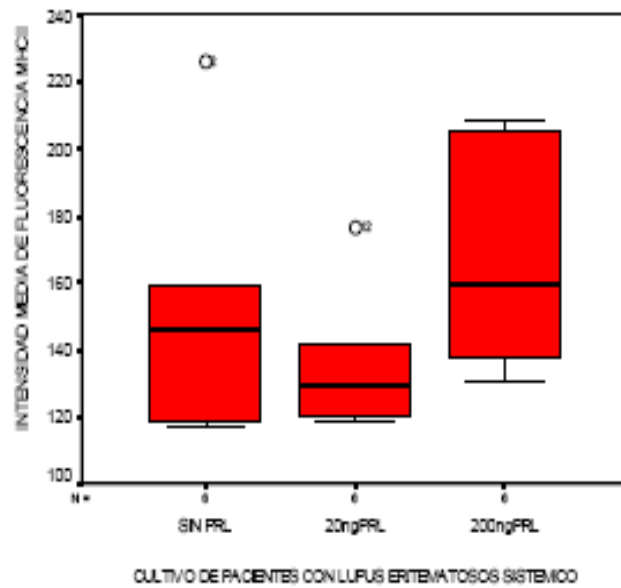


El análisis de ANOVA entre el grupo de pacientes y controles con una $p < 0.000$.
 El análisis de ANOVA entre los pacientes con LES obtuvo una $p < 0.252$.
 El análisis de ANOVA entre los controles obtuvo una $p < 0.782$.

GRAFICA 2
IMF ENTRE LOS CONTROLES



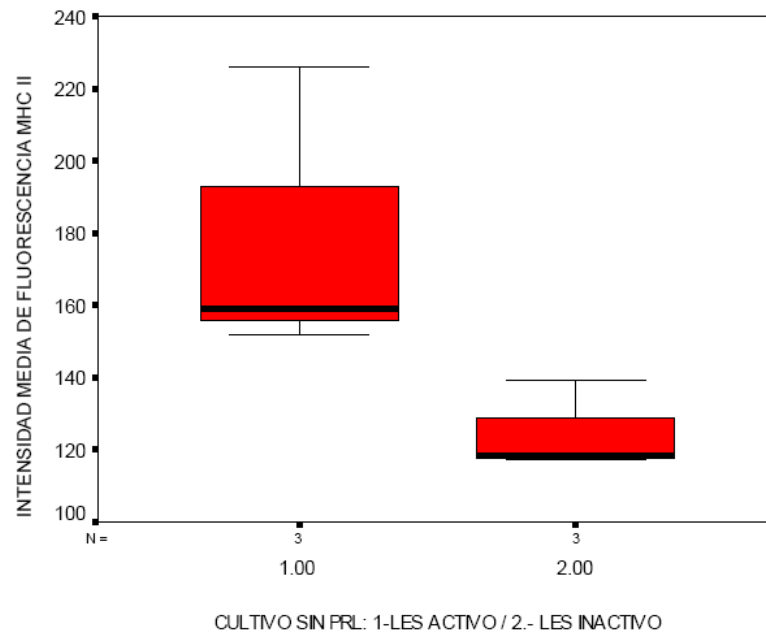
GRAFICA 3
IMF ENTRE LOS PACIENTES CON LES



Al observar que aunque no fue significativa el análisis entre los pacientes con LES gráficamente se puede observar algunas diferencias, por lo que se realizó un análisis de los resultados de los pacientes teniendo lo siguiente:

Se comparó el promedio de la IMF del MHCII de los cultivos celulares sin prolactina de los pacientes con LES activo y LES inactivo (gráfica 4).

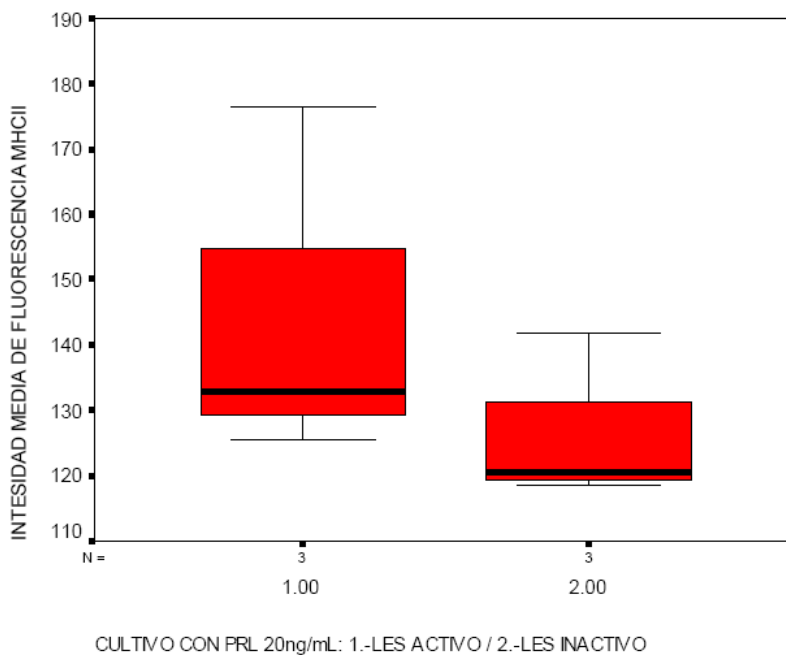
Gráfica 4
Comparación entre LES activo e inactivo sin PRL



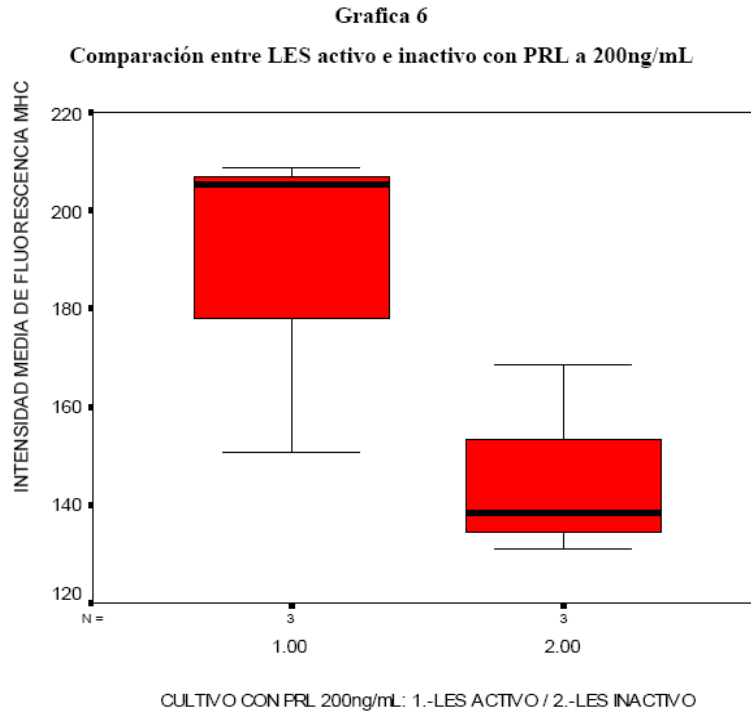
Se comparo el promedio de la IMF del MHCII de los cultivos celulares con prolactina a 20ng /mL de los pacientes con LES activo y LES inactivo (grafica 5).

Grafico 5

Comparación entre LES activo e inactivo con PRL a 20ng/mL



Se comparo el promedio de la IMF del MHCII de los cultivos celulares con prolactina a 200ng /mL de los pacientes con LES activo y LES inactivo (grafica 6).



Se utilizo la prueba de rangos de Wilcoxon teniendo los siguientes resultados en cada una de las combinaciones con los siguientes resultados (tabla 2):

Tabla 2

COMPARACION DE LES ACTIVO E INACTIVO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA A 2 COLAS
sin prolactina	0.109
con prolactina a 20ng/ml	0.285
con prolactina a 200ng/ml	0.109

Análisis y Discusión.

Con los resultados obtenidos podemos observar que los individuos independientemente de su estado de actividad de la enfermedad lupica sus células se encuentran en un estado de activación mas alta que de los individuos control, lo que pone de manifiesto una sobreactividad del sistema inmunológico; esta sobreactividad se ve manifestada por la sobreexpresión del MHCII de las mCDi condicionando que estas sean mas eficientes en la capacidad de presentar antígenos ya que durante esta etapa tienen una alta capacidad fagocítica, con este aumento en la actividad es posible que una mayor cantidad de autoantígenos sean presentados con mayor eficiencia en el ganglio linfático a las células efectoras (linfocitos) resultando en una producción de auto-anticuerpos.

Estadísticamente no hay diferencias entre la expresión del MHCII de las células cultivadas en diferentes condiciones (sin PRL, con PRL a 20ng/mL y PRL a 200ng/mL) pero al observar la grafica 2 y 3, podemos observar cambios en el comportamiento en la expresión del MHCII de mCDi, la expresión en el cultivo sin prolactina tiene una dispersión amplia mientras que se ve mas organizada en el cultivo con 20ng/mL probablemente el efecto de la PRL sobre las células menos activadas y además coordina una respuesta mas organizada del MHCII en todas las células ya que se observa una tendencia a homogenizar la IMF, mientras que en el cultivo con 200ng/mL se puede observar una expresión mas dispersa pero también una tendencia a expresarse con mayor intensidad en la mayoría aunque en algunas disminuye.

Al comparar los individuos con LES activo e inactivo encontramos que aunque estadísticamente no hay diferencias, se puede observar que al aumentar la concentración de la prolactina aumenta la expresión del MHCII principalmente a la concentración de 200ng/mL en los cultivos de los pacientes con LES activo, aunque a 20ng/mL esta expresión se ve disminuida en los activos pero con un aumento en los inactivos. Al parecer la PRL ejerce un efecto activador en los individuos inactivos a una concentración de 20ng/mL mientras que a 200ng/mL este efecto se hace evidente en los activos.

Conclusión:

Los pacientes con LES presentan un estado de activación continua independientemente del estado de actividad de la enfermedad.

La prolactina ejerce un efecto activador en los individuos con lupus inactivo a una concentración de 20ng/mL manifestado por un aumento en la IMF del MHCII de las mCDi. La prolactina ejerce un efecto activador en los individuos con lupus activo a una concentración de 200ng/mL manifestado por un aumento en la IMF del MHCII de las mCDi.

Aspectos Éticos

El presente proyecto no interfirió en ningún momento con la atención del paciente, se le informo de manera amplia y lo mas clara posible en que consistió su participación asegurando la confidencialidad de su persona, además de que los procedimientos están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki, se anexa carta de consentimiento informado.

Recursos Financieros y Factibilidad.

Se cuenta con la infraestructura necesaria para la obtención de la muestra, el procesamiento de la misma los cultivos necesarios y la evaluación por citometria de flujo, en el Banco Central de Sangre del Centro Medico La Raza junto con el personal acorde para el desarrollo de este proyecto, al tener personal capacitado en la obtención, separación de la muestra al igual que con los cultivos celulares y la evaluación de la citometria de flujo. Se cuenta con apoyo al financiamiento de proyectos de investigación (Fondo de Fomento a la Investigación) FOFOI 2005.

Presupuesto Ver anexo 2

Cronograma: Ver anexo 3.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gill JM, Quisel AM, Rocca PV, Walters DT. Diagnosis of Sytemic Lupus Erythematosus. Am Fam Physcian; 2003;68:2179-2186.
- 2.- Gaubitz M. Epidemiology of connective tissue disorders.. Rheumatology. 2006;45;Suppl 3:iii3-iii4.
- 3.- Mock C, Wong RWS. Pregnancy in systemic lupus erythematosus. Postgrad Med J 2001;77:157-165.
- 4.- Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. Curr Opin Rheumatol. 2006 Sep;18(5):456-61.
- 5.- Dostál C, Moszkorzová L, Musilová L, Lacinová Z, Marek J, Zvárová J. Serum prolactin stress values in patients with systemic lupus erythematosus Ann Rheum Dis 2003; 62:487–488.
- 6.- Jara LY, Vera-Lastra O, Misauda JM, Alcola M, Alseter-Nemegyli. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. Lupus 2001;10(special issue):748–56.
- 7.- Sugiura K, Muro Y, Watanabe A, Tomita Y. A case of systemic lupus erythematosus: continued association of circulating prolactin levels with disease activity over a 4-year follow-up period. Mod Rheumatol. 2005; 15 (3):220-2.
- 8.- Rezaieyazdi Hesamifard A Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. Rheumatol Int. 2006;26(11):1036-9.
- 9.- Pacilio M, Migliaresi S, Meli R, Ambrosone L, Bigliardo B, Di Carlo R. Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus--association with disease activity. J Rheumatol. 2001 Oct; 28 (10): 2216-21
- 10.- Smiti Khanfir M, Ghorbel BI, Feki M, Lamloum M, Mebazaa A, Miled M, Houman MH. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. A prospective study of 38cases. Tunis Med. 2004; 82 (6):512-5.
- 11.- Vera-Lastra O, Méndez C, Jara LJ, Cisneros M, Medina Get al. Correlation of Prolactin Serum Concentrations with Clinical Activity and Remission in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Effect of ConventionaTreatment. J Rheumatol 2003; 30(10):2140-6.
- 12.- Ben-Jonathan N. Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RM. Extrapituitary prolactin: regulation, functions and clinical aspects. Endocrinol Rev, 1996;17:639-669.
- 13.- Berczi I, Nagy E, The effect of prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function. In: Berczi I, Kovacs K, Editors. Hormones and immunity. Lancaster: MTP Press; 1987: 145.
- 14.- Grimaldi CM, Hill L, Xu X, Peeva E, Diamond B. Hormonal modulation of B cell: Developement and repertorio selection. Article in press. Immunol, 2004:1-10.
- 15.- DW Montgomery. Prolactin production by immune cells. Lupus, 2001; 10(10): 665-675.

- 16.- Buckley AR. Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus*,2001;10(10): 684-690.
- 17.- Welniak LA, Richards SM, Murphy WJ. Effects of prolactin on hematopoiesis.*Lupus*, 2001;10(10): 700-705.
- 18.- Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti E, Contarini M, Moro F, Basso G. Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum free conditions. *Immunol*, 2000; 100(1):29-36.
- 19.- Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen Capture, Processing and Presentation Dendritic Cells: Recent Cell Biological Studies. *Human Immunol*, 1999; 60:562-567.
- 20.- Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, Malefy RW, Liu YJ. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 1999;283:1183-1186.
- 21.- Cravens PD, Lipsky P. Dendritic cells, chemokine receptor and autoimmune inflammatory disease. *Inmunol and Cell Biol*, 2002;80:497-505.
- 22.- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991; 9: 271-296
- 23.- Bancherreau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*,1998;392:245-252.
- 24.- Bancherreau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev*, 2000 ; 18 :767-811
- 25.- Jacobi AM, Rohde W, Volk H-D, Dörner, Burmester GR, Hiepe F. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:242-247.
- 26.- Matera L, Mori M, Galetto A. Effect of Prolactin on the antigen presenting function of monocyte derived dendritic cells. *Lupus*, 2001;10(10):728-734.
- 27.- Enhanced expression of CD69 and CD25 on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocrine Journal*.2005;52(5):635-641.
- 28.- Stevens A, Ray DW, Worthington, Davis JRE. Polymorphisms of the human prolactin gene – implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2001; 10 (10): 676-683.
- 29.- Le-Yuang, Yu-Lee. Stimulation of interferon regulatory factor-1 by prolactin.*Lupus*, 2001;10(10): 691-699.
- 30.- Méndez I, Alcocer-Varela J, Parra A, Lava-Savala A, De la Cruz DA, et al. Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin.*Lupus*, 2004; 13:45-53.
- 31.- Leañós-Miranda A, Cardenas-Mondragón G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity.*Rheumatology*. 2006;45(1):97-101.

- 32.- Garcia M, Colombani-Vidal ME, Zylbersztein CC, Testi A, Marcos J, Analysis of molecular heterogeneity of prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(8):575-83
- 33.- Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley RB. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis *in vivo*. *Endocrinol*, 2003; 144 (5): 2102-2110
- 34.- Decker P, Kotter I, Klein R, Berner B, Rammensee HG Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*.2006; 45(9):1087-95.
- 35.- Yacoub Wasef SZ. Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend Med*. 2004;1(1):12-7
- 36.- Walker SE. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus.. *Lupus*.2001;10(10):762-8
- 37.- Walker SE. Treatment of systemic lupus erythematosus with bromocriptine. *Lupus*.2001;10(3):197-202
- 38.- Yang XY, Liang LQ, Xu HS, He M, Yao SZ, et al. Efficacy of oral bromocriptine in protecting the postpartum systemic lupus erythematosus patients from disease relapse *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*.2003;42(9):621-4.

Anexol

Carta de consentimiento informado para participación proyectos de investigación científica

México D.F., a ____ de _____ del 2005

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación:

“EFECTO DE LA PROLACTINA EN LA EXPRESION DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD II (MHC II) DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)”.

Registrado ante el comité local de investigación con el número 2005-3501-017. El objetivo de este estudio es conocer el comportamiento inmunológico de los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Se me ha explicado que se utilizarán aproximadamente 150mL de sangre los cuales serán tomados por medio de una punción en la vena, realizada durante la hospitalización ó durante la toma de muestras para estudios de laboratorio (en caso de ser paciente con LES) o durante la donación de sangre (disponente sanguíneo voluntario).

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos: moretón, dolor y/o hinchazón en el sitio de toma de la muestra de sangre, así como los beneficios derivados de su participación en el estudio que como son una mejor comprensión de la enfermedad. El investigador principal se ha comprometido responder las preguntas o cualquier duda que yo le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme en cualquier momento del estudio sin que esto influya sobre la atención que recibo por esta institución, así como que dicha participación no tendrá ningún costo (no pagaré por la participación en el estudio).

El investigador principal me ha dado la seguridad de que los datos obtenidos serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionar la información actualizada que se obtenga durante el estudio.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador

Nombre y firma de testigo

Nombre y firma de testigo

Anexo 2
Presupuesto de reactivos y materiales

Articulo	Costo unitario	Subtotal
Selector de monocitos (2)	\$13,135	\$26,270
RPMI 1640 (4)	\$ 165	\$ 660
Ficoll Paque (2)	\$ 945	\$ 1,890
Suero Fetal Bovino (2)	\$ 5,610	\$11,220
Factor Estimulante de Colonias Granulocitos –Monocitos (2)	\$ 3,000	\$ 6,000
Hr-Interleucina 4	\$ 6,070	\$ 6,070
r-Prolactina (2)	\$ 3,270	\$ 6,540
Anti CD 11	\$ 6,215	\$ 6,215
Anti CD 14	\$ 6,215	\$ 6,215
Anti MHC II	\$ 6,215	\$ 6,215
Insulina Bovina	\$ 3,550	\$ 3,550
Holo-transferrina	\$ 5,060	\$ 5,060
Selenito de Sodio	\$ 740	\$ 740
Suscripción anual Internet	\$ 5,000	\$ 5,000
Unidad USB portátil	\$ 2,500	\$ 2,500
Suscripción a Journals	\$ 2,000	\$ 2,000
Material de oficina	\$ 1,000	\$ 1,000
Total	\$ 70,690	\$97,145

Anexo3
Cronograma

Actividades	Mar	Abr	may	jun	jul	Ago	Sep	oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr
Corrección del protocolo	X	X												
Revisión y autorización por el comité local y los comités externos		X	X											
Estandarización de las técnicas				X	x	X	X							
Captación, y procesamiento de muestras								X	X	X	X			
Revisión resultados. Análisis estadístico. Reporte final												X	X	X