

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

REGULACIÓN DOPAMINÉRGICA NEUROENDOCRINA DE LA
PROLACTINA EN EL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ

TUTOR:

DR. FERNANDO LARREA GALLO

MÉXICO, D. F.

2007



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.

REGULACIÓN DOPAMINÉRGICA NEUROENDOCRINA DE LA PROLACTINA EN EL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando Larrea Gallo en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

El jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por :

Presidente	Dr. Horacio Merchant Larios
Secretario	Dr. Fernando Larrea Gallo
Vocal	Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Vocal	Dra. Teresa Morales Guzmán
Vocal	Dr. José Moreno Rodríguez
Suplente	Dr. Edgar Zenteno Galindo
Suplente	Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

El proyecto de investigación de la presente tesis se realizó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de los proyectos **31049-M** y **43893-M** y la beca recibida con No. de becario **113989**.

DEDICATORIAS

A mis amados padres, Efraín y Graciela, por darme la vida y por todo su amor y su apoyo.

A mis hijos, Karla y Daniel, por alegrar cada día de mi vida y ser una motivación constante para lograr mis metas.

A mi amado esposo Carlos, por los momentos compartidos, por apoyarme siempre para el logro de mis metas profesionales.

A mi hermano Efraín, siempre ejemplo de perseverancia y excelencia.

A mis queridos compañeros de laboratorio, investigadores y alumnos, por las enseñanzas y por hacer las horas de trabajo más agradables.

RECONOCIMIENTOS

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo de tesis.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por apoyar la formación de profesionales e investigadores.

Al Dr. Fernando Larrea G. por su tutoría y apoyo incondicional para realizar este proyecto de investigación.

Al comité tutorial, el Dr. Carlos Rosales Ledezma, el Dr. Alejandro García Carrancá y el Dr. Fernando Larrea G., por su valiosa asesoría.

Al National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK) por los reactivos donados para la realización de los diferentes análisis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero de los proyectos **31049-M** y **43893-M** y la beca otorgada con No. de becario **113989**.

A los miembros del jurado por la revisión crítica de la presente tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme nuevamente la oportunidad de obtener un posgrado.

El objetivo sólo existe en la medida en que un hombre es capaz de soñar con alcanzarlo. Lo que justifica su existencia es el deseo sin el cual el objetivo sería un sueño distante, una fantasía. Hay que luchar por los sueños pero también hay que saber que cuando algunos caminos se muestran imposibles, es mejor guardar fuerzas para intentar otras vías. Cuando hagas una elección, olvida las otras alternativas. Quien sigue un camino y se queda pensando en lo que perdió al dejar los otros, no llegará a ninguna parte.

Inédito

La vida es caer y volver a levantarse,
es querer subir a lo alto de uno mismo.

Tienes brillo, la luz que proviene de la fuerza de voluntad de quien sacrifica cosas importantes en nombre de otras que juzga más importantes todavía. Esa luz se manifiesta en los ojos.

“Once minutos”, Paulo Coelho

INDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
I. Generalidades.....	5
II. Gen y estructura de la PRL.....	5
III. Regulación de la síntesis de la PRL.....	9
IV. Acciones de la PRL en el sistema inmunológico.....	14
V. PRL y autoinmunidad.....	15
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
I. SUJETOS.....	20
II. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
III. MÉTODOS.....	21
1. Preparación de las células y cultivo celular.....	21
2. Determinaciones hormonales.....	22
3. Determinación de la actividad biológica de la PRL.....	23
4. Análisis de la heterogeneidad molecular de la PRL linfocitaria.....	24
5. Análisis de la expresión del RNAm de la PRL por RT-PCR y Southern-blot....	25
6. Cultivo de CMNP estimuladas in vitro.....	26
7. Radioinmunoanálisis de AMPc.....	27
8. Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
1. Características clínicas de los sujetos.....	29
2. Efectos de la administración de metoclopramida en las concentraciones de PRL en suero.....	30
3. Prolactina linfocitaria.....	34
4. Análisis de la heterogeneidad molecular de la PRL.....	40
5. Análisis de la expresión del RNAm de la PRL.....	42
6. Efecto de activadores de la vía del AMPc en la expresión del RNAm de la PRL.....	44
7. Efecto de la dopamina en el contenido intracelular de AMPc y en la expresión del RNAm de la PRL.....	47
8. Efecto de la IL-2 en el contenido intracelular de AMPc y en la expresión del RNAm de la PRL.....	51
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXO.....	72

RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona proteínica de origen hipofisario y linfocitario que ha sido considerada por algunos autores como una citocina. Es conocido que una cohorte de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) cursan con hiperprolactinemia y la expresión de la PRL linfocitaria es mayor que en sujetos sanos. En el presente estudio, se evaluó la PRL inmunorreactiva y bioactiva en el suero y en el medio de cultivo de células mononucleares periféricas (CMNP) de mujeres con LEG y de mujeres sanas, tanto en condiciones basales como en respuesta a la administración de un antagonista dopaminérgico, la metoclopramida. También se estudió el patrón de isoformas de la PRL en suero y la secretada por las CMNP, así como la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP. Las concentraciones basales de PRL circulante, bioactiva e inmunorreactiva, fueron similares en ambos grupos. La respuesta en la secreción de la PRL a la circulación fue mayor en el grupo LEG que en el grupo control, siendo más evidente en términos de la PRL bioactiva. La secreción y expresión basales de PRL en las CMNP fueron mayores en el LEG, las cuales aumentaron posterior al estímulo anti-dopaminérgico solamente en el grupo control. La dopamina y la IL-2 modificaron la expresión del RNAm de la PRL en CMNP *in vitro*. En conclusión, el presente estudio demostró que la actividad del sistema dopaminérgico a nivel hipotalámico está aumentada en el LEG y sugiere la contribución de la PRL linfocitaria alterando la actividad del sistema dopaminérgico como un mecanismo de adaptación para mantener las concentraciones fisiológicas de la PRL en la circulación.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) secretion by the pituitary is under the control of dopamine. Hyperprolactinemia has been found in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and seems to be associated with clinical activity. T-lymphocytes express PRL and those from SLE patients appear to secrete more PRL than controls. In this study, immuno-(RIA) and bio-(BIO) assayable PRL in both serum and culture media of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) from SLE and control subjects were evaluated in the basal state and in response to 10 mg oral administration of metoclopramide, a dopamine receptor antagonist. Prolactin size heterogeneity in serum and culture media and PRL gene transcription in PBMNC were also studied. Basal serum RIA-PRL, BIO-PRL and the BIO/RIA ratio were similar in both groups. The serum BIO-PRL response after metoclopramide was higher than RIA-PRL in SLE, and this increment was also greater than in control subjects. PBMNC from SLE subjects secreted and produced more BIO-PRL. After metoclopramide, secretion and production of PRL increased only in PBMNC from control women and not in those from SLE patients. The present study demonstrated an increased central dopaminergic tone in SLE and suggests that lymphocyte-derived PRL might contribute to alter the functional activity of the hypothalamic dopaminergic system in SLE attempting to maintain serum PRL within a physiological range.

I. Generalidades

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica que es principalmente sintetizada y secretada por la hipófisis anterior. Sus efectos están relacionados con la reproducción, el desarrollo y crecimiento, el balance de líquidos y electrolitos y la regulación del sistema inmunológico [1]. La expresión del gen de la PRL se encuentra bajo la regulación de factores de transcripción tejido-específicos, así como por diferentes neurotransmisores y factores de naturaleza hormonal. Entre ellos, la dopamina hipotalámica es el principal regulador tanto de la síntesis, como de la secreción de la PRL. Además de la glándula hipofisaria, la PRL humana es sintetizada en diferentes sitios extrahipofisarios como: el miometrio uterino, la decidua placentaria y diversas células del sistema inmunológico [2]. En el sistema inmunológico, la PRL ejerce efectos paracrinos y autocrinos y está relacionada a procesos de autoinmunidad. En la actualidad, la PRL es considerada no sólo como una hormona, sino también como una citocina.

II. Gen y estructura de la PRL

La PRL humana es producto de la expresión de un solo gen y consiste de varias isoformas o variantes moleculares, productos de modificaciones postraduccionales que le confieren diferentes características fisiológicas relacionadas con su actividad biológica [3]. El gen de la PRL humana se extiende a lo largo de 15 kb y consiste de cinco exones y cuatro intrones (Fig. 1) [4]. El primer exón está constituido por una región 5' no traducible y por otra que se traduce, en parte, al péptido de señal. El segundo exón se traduce al resto del péptido de señal y 40 aminoácidos de la PRL madura. El tercer y cuarto exones se traducen a los aminoácidos 41-76 y 77-136,

respectivamente. El quinto exón se traduce a los aminoácidos 137-199 y contiene, además, una región 3' no traducible [4]. Un exón adicional (exón 1a) está localizado a 5.8 kb del exón 1 hacia la región 5' (Fig. 1) [5, 6]. Este exón se transcribe sólo en tejidos extrahipofisarios tales como el endometrio y las células del sistema inmunológico y genera, a través de su empalme con el primer exón, un RNAm de aproximadamente 150 pb mayor que el producto de transcripción de origen hipofisario (Fig. 1). Esta variante, producto de la regulación de un promotor distal o alternativo, difiere únicamente en el tamaño en su región 5' que corresponde a una secuencia no traducible, y por lo tanto, los productos de traducción son idénticos a la PRL hipofisaria (Fig. 1) [2].

El promotor que dirige la transcripción de la PRL humana en la hipófisis contiene tres sitios de unión para el factor de transcripción Pit-1 localizados hacia el extremo 5', inmediatamente antes del sitio de inicio de la transcripción en el exón 1 [2]. Este conjunto de elementos conforman al promotor proximal que regula la expresión del gen de la PRL en la hipófisis. Existe otro conjunto de elementos, conocido como aumentador distal, localizado río arriba a 2.5 kb del promotor hipofisario que contiene ocho sitios para Pit-1 y elementos de respuesta para el receptor de estrógenos (ERE) (Fig. 1), con funciones tanto de estimulación como de inhibición de la transcripción. La dopamina es considerada como el inhibidor más importante de la síntesis de la PRL hipofisaria y sus acciones son mediadas por la disminución del contenido intracelular de AMP cíclico, cuyo efecto está a nivel de la regulación de la transcripción de Pit-1 [7].

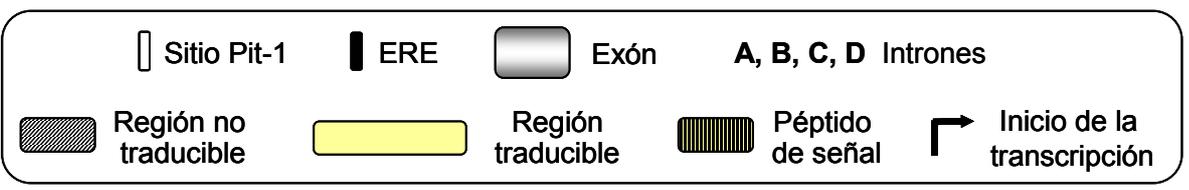
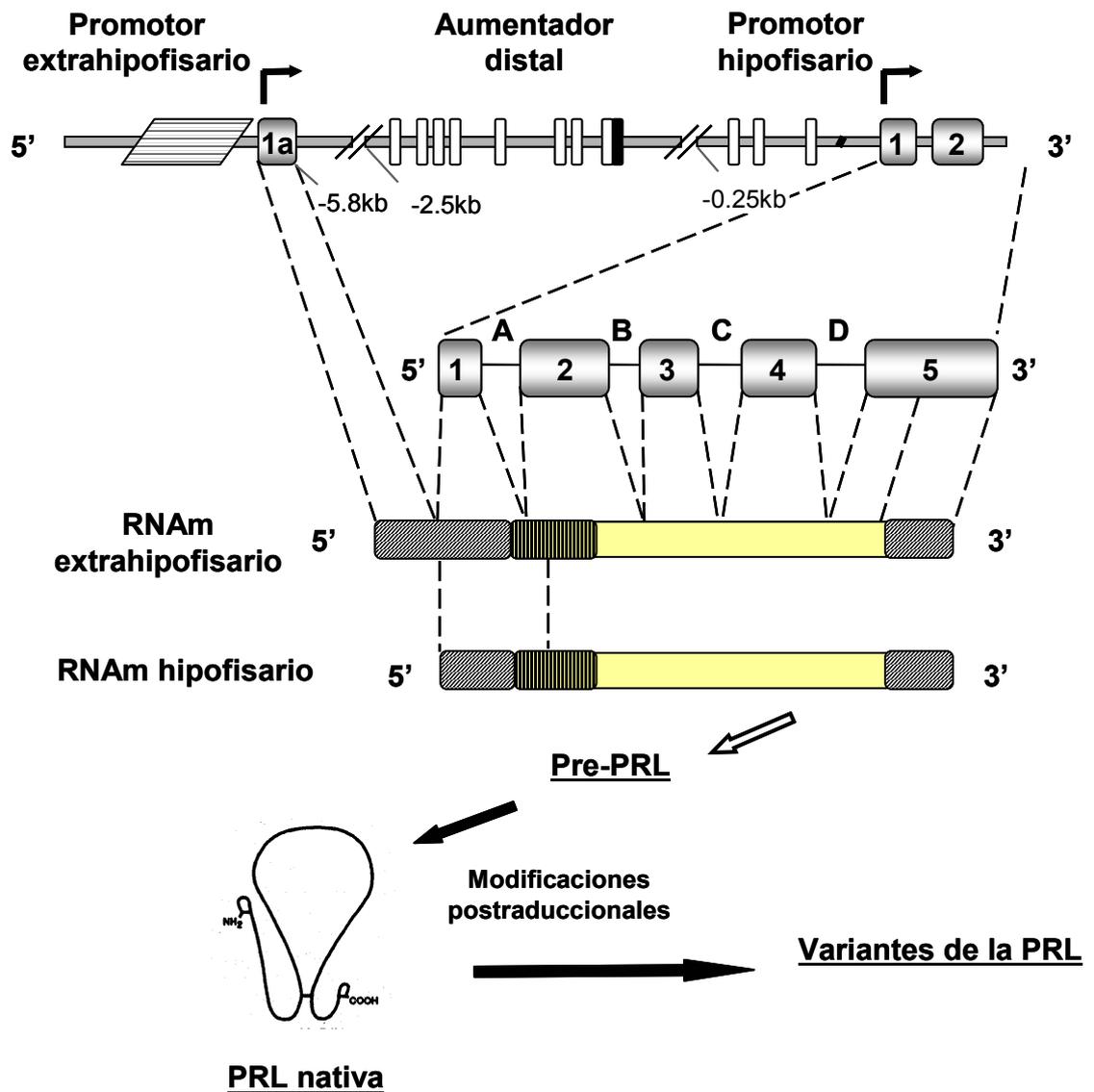


Fig. 1 Representación esquemática de la estructura del gen de la PRL humana mostrando las regiones traducible y no traducible, los sitios de inicio y los productos de la transcripción de los promotores hipofisario y extrahipofisario. También se muestran el producto de la traducción (ERE, elementos de respuesta a estrógenos) (Basado en la ref. 2).

La prolactina, como la mayoría de las hormonas de naturaleza proteínica sintetizadas por la hipófisis, se caracteriza por ser de naturaleza heterogénea, es decir, está presente en isoformas o variantes moleculares.[3, 8, 9] Esta propiedad estructural se manifiesta cuando la hormona es analizada tomando en consideración sus propiedades fisicoquímicas tales como, peso molecular o punto isoeléctrico. En la mayoría de los mamíferos, la hipófisis sintetiza a la PRL como una molécula de 197 a199 aminoácidos y tres puentes disulfuro, lo que origina la formación de tres asas a lo largo de su estructura. La forma molecular predominante de la PRL es la especie de 23.5 kDa, y por modificaciones postraduccionales, esta molécula nativa puede ser glicosilada, dimerizada, hidrolizada o unirse a proteínas circulantes, como las IgG, para dar origen a las distintas formas moleculares [3, 8-12]. Asimismo, tanto líneas celulares de linfocitos T, como células mononucleares de sangre periférica (CMNP) humanas sintetizan y secretan la isoforma de PRL de 23 kDa [13] y una variante con peso molecular aparente de 60 kDa [14, 15].

La heterogeneidad estructural de la PRL tiene importancia fisiológica ya que de ella depende parcial o totalmente una serie de propiedades de la hormona tales como la unión a sus receptores, su depuración metabólica y tiempo de vida media circulante y su actividad biológica, conduciendo a una diversidad de respuestas biológicas en el organismo. De tal forma que, las concentraciones de PRL cuantificadas por su inmunorreactividad (PRL-RIA) no reflejan la actividad biológica (PRL-BIO) de las especies moleculares presentes en una muestra. Cambios en el valor del cociente bioactividad/inmunorreactividad (BIO/RIA) sugieren la presencia de diferentes formas moleculares de la PRL. Sin embargo, deben descartarse diferencias debidas a la capacidad de los anticuerpos de identificar a la PRL de manera similar en diferentes diluciones de la muestra y con respecto a una preparación estándar, empleando curvas de paralelismo.

Por su polimorfismo estructural y la ubicuidad de sus receptores de membrana, la PRL es una molécula con diversas acciones. La existencia de isoformas de la PRL de origen tanto hipofisario, como

linfocitario puede tener implicaciones funcionales o ser consecuencia del estado fisiológico o patológico del individuo.

III. Regulación de la síntesis de la PRL

La glándula hipófisis es el origen principal de la PRL circulante. Las células productoras de esta hormona llamadas lactotrofos representan cerca del 40-50% del total que conforman la adenohipófisis. La secreción de la PRL hipofisaria hacia la circulación es de manera pulsátil a razón de 14-20 pulsos en 24 h, de manera similar a lo que ocurre con otras hormonas hipofisarias [16]. Esta característica de secreción pulsátil depende de la interrupción intermitente de la actividad dopaminérgica a nivel hipotalámico [7]. El método más utilizado para la determinación de la PRL en el suero o líquidos biológicos es el radioinmunoanálisis [17]. Además, es posible determinar la actividad biológica de esta hormona a través de su propiedad de inducir la proliferación celular de la línea celular Nb2 de linfocitos T de rata [18]. Las concentraciones circulantes de la PRL en el humano son generalmente inferiores a 20 $\mu\text{g/L}$ y son ligeramente mayores en mujeres que en hombres [19], lo que muy probablemente es secundario al efecto positivo de los estrógenos sobre su síntesis.

El principal efecto regulador de la funcionalidad de los lactotrofos lo ejerce el hipotálamo, a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario [20]. La PRL está bajo un complejo de regulación dual que involucra procesos de estimulación e inhibición mediante mecanismos de naturaleza neuroendocrina y paracrina. La dopamina es considerada como el factor fisiológico más importante que modula la síntesis de la PRL hipofisaria, siendo su efecto de naturaleza inhibitoria [7]. Este neurotransmisor es sintetizado por el sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, que ocupa desde el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal hasta la eminencia media y se transporta a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario hasta los lactotrofos (Fig. 2) [19]. Asimismo, en un mecanismo de autorregulación o retroalimentación de asa corta, la PRL de origen hipofisario modifica la actividad

dopaminérgica del hipotálamo. El aumento en la secreción de la PRL por el lactotrofo estimula la secreción de la dopamina para inhibir, a su vez, la secreción aumentada de la PRL (Fig. 2) [21, 22].

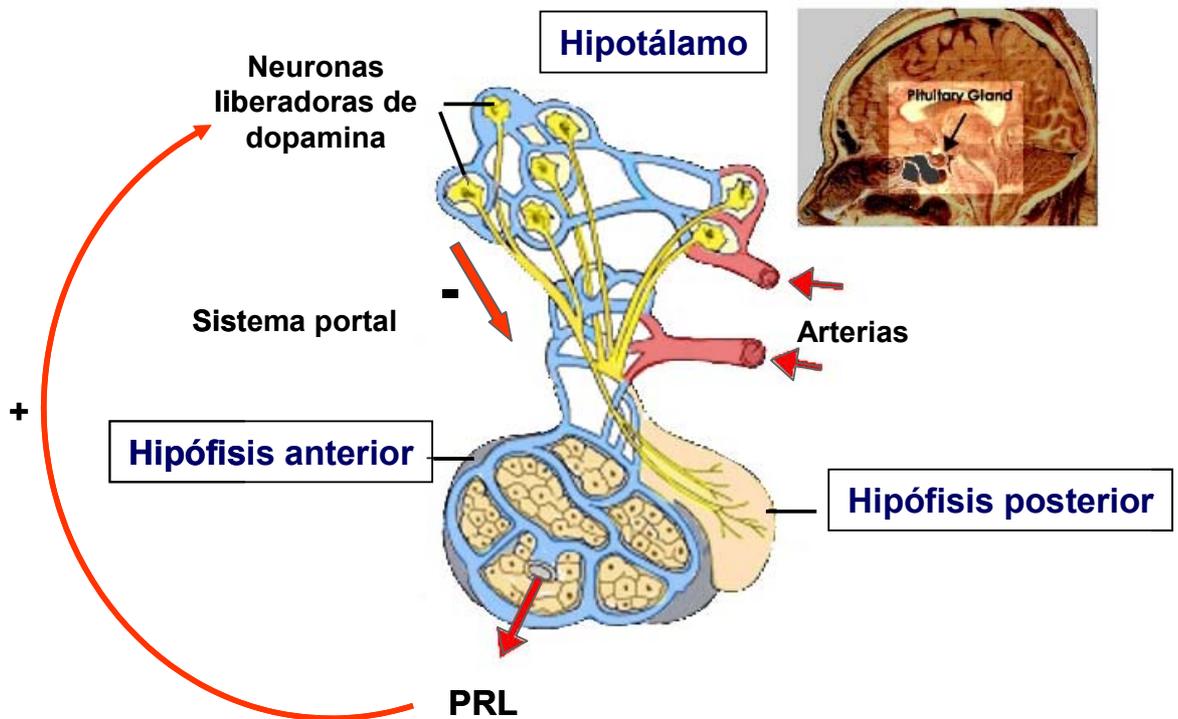


Fig. 2 Sistema hipotálamo-hipofisiario. La dopamina de origen hipotalámico se secreta y se transporta a través de la circulación portal hacia la hipófisis, donde se une a receptores específicos presentes en los lactotrofos para inhibir tanto la síntesis como la secreción de la PRL. En un mecanismo de retroalimentación de asa corta, la PRL regula su propia síntesis estimulando positivamente las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo.

En condiciones fisiológicas, la producción basal de la PRL hipofisaria está bajo el control tónico inhibitorio mediado por la dopamina hipotalámica [7]. En estados patológicos, la presencia de hiperprolactinemia puede deberse a la disminución del tono de la dopamina a nivel central [23, 24]. La administración oral de un agente antagonista dopaminérgico, como la metoclopramida ha sido utilizada como herramienta para evaluar de manera indirecta el estado del tono dopaminérgico hipotalámico en diferentes condiciones clínicas [25-28]. La metoclopramida bloquea los receptores dopaminérgicos presentes en los lactotrofos hipofisarios, produciendo una respuesta aguda y relativamente sostenida en la secreción de la PRL hipofisaria a la circulación, al impedir el efecto inhibitorio de la dopamina hipotalámica [25-28]. Consecuentemente, una respuesta mayor en la concentración de PRL secretada a la circulación indica que el tono dopaminérgico está aumentado.

En la hipófisis, el mecanismo de acción de la dopamina inicia al unirse a receptores específicos, localizados en la membrana celular, inhibiendo la expresión de los productos de transcripción génica de la PRL [29]. Existen 5 subtipos de receptores para dopamina que están divididos en dos familias o tipos: D1 y D2 y se distinguen por sus características farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas [30]. Los receptores D1 se dividen en dos subtipos: D1 y D5, mientras que los receptores D2 se dividen en tres subtipos: D2, D3 y D4 [7, 30, 31]. La unión de la dopamina a receptores del tipo D2, localizados en la membrana de las células productoras de PRL en la hipófisis, activa mecanismos de señalización que resultan en la disminución del contenido intracelular de AMP cíclico (AMPC), la movilización de calcio intracelular y la regulación de la transcripción de Pit-1 (Fig. 3) [7, 29, 32].

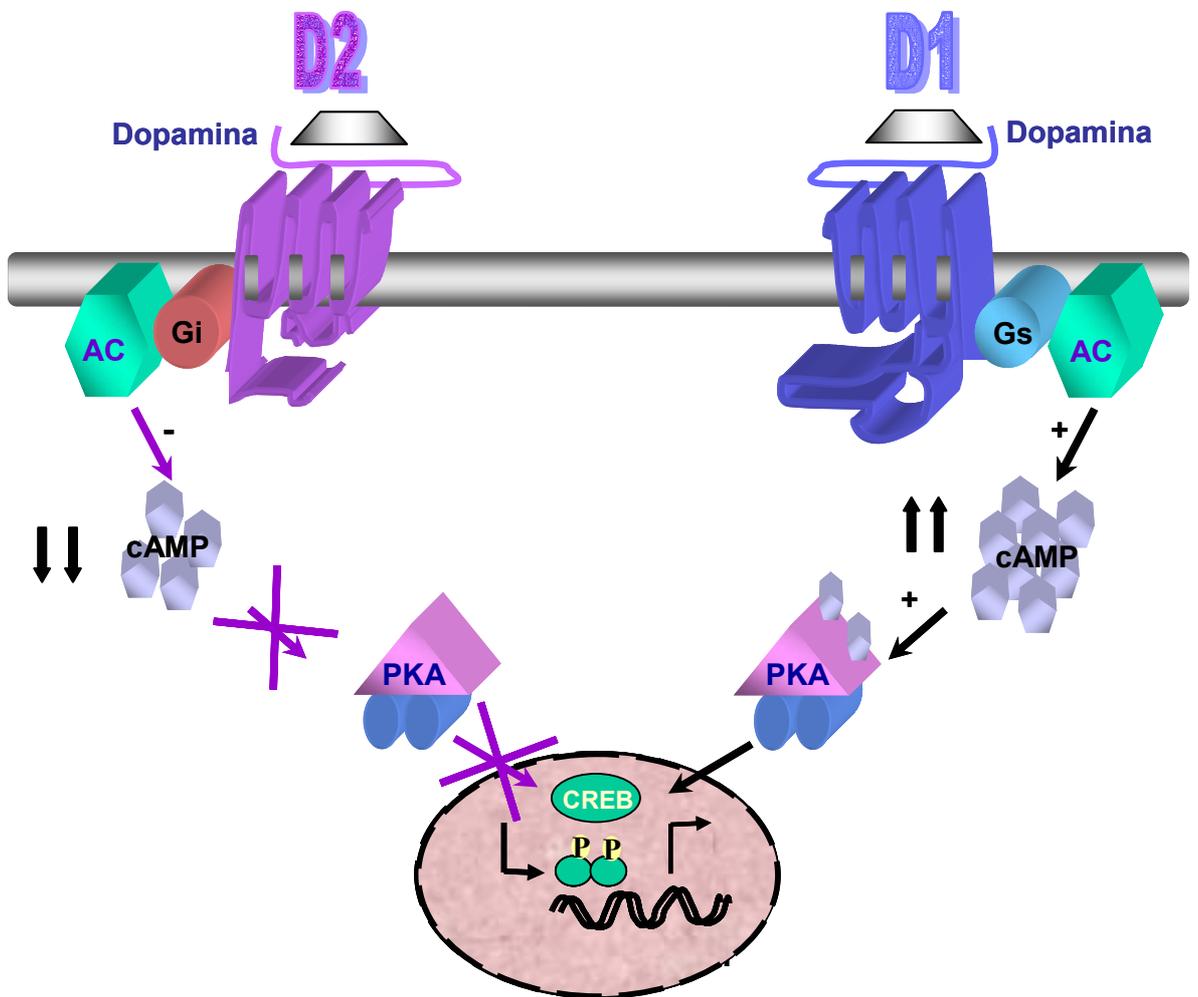


Fig. 3 Diagrama comparativo de los receptores del tipo D1 y D2 de la dopamina. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G. Los receptores D1 estimulan la actividad de adenilato ciclasa y promueven la síntesis de AMPc, mientras que los receptores D2 inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y disminuyen la concentración de AMPc intracelular (Gs, proteínas G estimuladoras; Gi, proteínas G inhibitorias; AC, adenilato ciclasa; PKA, proteína cinasa A).

En los tejidos extrahipofisarios, la transcripción del gen de la PRL es regulada por el promotor alterno (Fig. 1), pero se conoce aún poco acerca de los mecanismos implicados en dicha regulación. Aunque el promotor alterno contiene dos secuencias consenso de unión para Pit-1 este factor no modifica la transcripción del gen de la PRL en la decidua o en las células linfoides [2, 33], lo que sugiere que el mecanismo de control de la expresión génica de la PRL linfocitaria es tejido-específico. La regulación de la transcripción depende tanto de los receptores expresados como del ambiente intracelular, o de los factores de transcripción presentes en la célula, responsables de la expresión del gen de la PRL [34]. El promotor alterno es activado por análogos del AMPc y por la proteína cinasa A, debido a la presencia de una secuencia que pertenece a la familia de elementos de respuesta a AMPc (CRE) en este promotor [6, 35, 36]. La actividad transcripcional de este promotor se incrementa hasta seis veces cuando es estimulada con análogos de AMPc en las células Jurkat de linfocitos T humanos y en células estromales de endometrio, ambas transfectadas con genes reporteros [6, 33, 36]. Dicha actividad también es inducida por activadores de linfocitos T en las células Jurkat, como la fitohemaglutinina y ésteres del forbol como el PMA, que, además, tienen efecto sinérgico con el AMPc [36]. Estos hallazgos sugieren la participación de ligandos que actúan a través de modificar el contenido intracelular de AMPc en el control de la síntesis de la PRL en los tejidos extrahipofisarios.

En la actualidad, no existe evidencia suficiente que apoye el efecto de la dopamina en la transcripción del gen de la PRL en las células del sistema inmunológico. Sin embargo, la presencia de receptores para dopamina en la superficie de los linfocitos y la síntesis local de este neurotransmisor, que ejerce efectos en los mismos linfocitos, sugieren la presencia de mecanismos de regulación autocrina de la dopamina en la síntesis de la PRL linfocitaria [37-39]. En el sistema inmunológico, la dopamina modifica el proceso de apoptosis en las CMNP, aumenta la proliferación inducida por mitógenos en linfocitos T y B e inhibe la

expresión del RNAm de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas en CMNP humanas, además de inhibir la secreción de citocinas en linfocitos T humanos [40-44].

IV. Acciones de la PRL en el sistema inmunológico

La PRL es una molécula con amplia versatilidad funcional. Las acciones biológicas de la PRL en el humano las realiza principalmente a nivel de la esfera reproductiva, sin embargo, acciones sobre otros sistemas como el sistema inmunológico han sido descritos[2, 45]. Esta hormona lleva a cabo sus efectos biológicos a través de la unión a receptores específicos de membrana que pertenecen a la familia de receptores de citocinas tipo 1 [46, 47].

La PRL es considerada una citocina, debido a que es sintetizada por diversas células del sistema inmunológico [48], principalmente por los linfocitos T, y actúa localmente como un factor autocrino y paracrino [49, 50]. Esta proteína ejerce efectos mitogénicos o co-mitogénicos con otras citocinas y lectinas en los linfocitos T y B y en las células asesinas naturales o NK [51-55], tiene la capacidad de estimular la actividad citotóxica de las células NK y del factor de transcripción regulador del interferón (IRF-1), y la síntesis de otras citocinas como la IL-2 y la IL-12 y de algunos de sus receptores [51, 54], además de contribuir con las acciones de ambas citocinas en los linfocitos estimulando la síntesis de el interferón-gamma (IFN- γ) en los linfocitos T y en las células NK [51, 54, 56, 57].

La PRL es considerada un agente anti-apoptótico en los sistemas reproductor e inmunológico [58-61]. Esta hormona-citocina previene la apoptosis inducida por el óxido nítrico y la dexametasona en la línea celular Nb2 [61] y modula tanto la expresión de genes implicados en la apoptosis (bax y bcl-2), como la activación de la caspasa-3 [59, 62, 63]. La PRL tiene un papel fisiológico importante en el mantenimiento de la supervivencia y funcionalidad del sistema inmunológico en estados de estrés, en los que tanto las concentraciones de PRL como de glucocorticoides se elevan, pero sus funciones se contrarrestan, ya que previene la apoptosis en los linfocitos T inducida por los

glucocorticoides [58]. Asimismo, la PRL puede ser considerada como un modulador de la supervivencia celular.

En modelos “knockout”, en los que la expresión del receptor de la PRL está anulada, la funcionalidad de las células inmunológicas, así como la linfopoyesis, la inmunidad innata, la capacidad de producir anticuerpos o de proliferar en presencia de estímulos mitogénicos *in vitro* se encuentran intactas [64, 65]. Estos hallazgos sugieren que el desarrollo del sistema inmunológico y sus funciones progresan normalmente en ausencia de las señales mediadas por la PRL, indicando que tanto la presencia de PRL como de su receptor no son esenciales.

A la PRL se la ha relacionado con estados de autoinmunidad, sin embargo, tanto sus acciones sobre el sistema inmunológico como su papel en el curso de estas patologías permanecen aún desconocidas.

V. PRL y autoinmunidad

La relevancia clínica de la PRL sobre el sistema inmunológico en el humano permanece desconocida; sin embargo, existen algunas evidencias que apoyan el papel de esta hormona sobre el curso de ciertas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG).

El LEG es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida caracterizada por un espectro amplio de manifestaciones clínicas y alteraciones inmunológicas. Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva en una relación 10:1 con respecto a los hombres, lo que probablemente implique la participación de factores hormonales como condicionantes de la enfermedad. Esta patología se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos propios, como proteínas nucleares, DNA e histonas, entre otros.

La PRL ha sido relacionada con diversas entidades autoinmunes como la artritis reumatoide [66, 67] y el LEG. En este sentido, diversos estudios han informado que una cohorte de sujetos afectados con LEG cursa con hiperprolactinemia [68-73], situación en donde la

participación de la PRL permanece aún controversial. A ese respecto, algunos autores señalan que existe correlación entre las concentraciones de PRL circulante y las manifestaciones y signos clínicos de la enfermedad [69-71, 73, 74]. No obstante, otros estudios establecen claramente que aunque las concentraciones de PRL circulante sean ligeramente, pero significativamente mayores a las observadas en sujetos control, éstas no se encuentran asociadas con el índice de actividad de la enfermedad, así como con marcadores de la actividad de linfocitos T [72, 75-78]. Estas inconsistencias pueden deberse a la heterogeneidad presente en los grupos estudiados, en donde factores como la edad y la ingesta de fármacos influyen en la actividad del lupus o en las concentraciones circulantes de PRL. El aumento moderado de las concentraciones circulantes de esta hormona en algunos casos de LEG sugiere la participación de tejidos extrahipofisarios en la poza de PRL circulante. Interesantemente, la secreción de la PRL por los linfocitos de pacientes con LEG es significativamente mayor que la observada en sujetos sanos [15, 79]. Estas diferencias entre sujetos sanos y sujetos afectados con LEG permanecen desconocidas en la actualidad.

Por otra parte, la supresión de la secreción de PRL con agentes agonistas dopaminérgicos resulta en cambios sobre el sistema inmunológico similares a los observados con la remoción de la glándula hipofisaria, siendo estos efectos revertidos con el tratamiento con PRL exógena [80]. En ratones NZB/W, un modelo de LEG, el tratamiento con agonistas dopaminérgicos, como la bromocriptina, induce la supresión de las concentraciones circulantes de PRL circulante y al retardo en la producción de auto-anticuerpos y la consecuente inhibición del desarrollo y curso clínico de la enfermedad [81]. En este modelo, el implante de glándula hipofisaria provoca el aumento en las concentraciones en el suero de IgG circulante y acelera la mortalidad [81]. La desregulación en los mecanismos de síntesis y secreción de la PRL en el LEG podría ser una posible explicación del aumento en su secreción citocina por los linfocitos de estos pacientes, sin descartar el polimorfismo de un solo nucleótido (G/T) que ha sido descrito en el

promotor del gen de la PRL en los linfocitos T de pacientes con LEG [82]. Todas estas observaciones sugieren la participación de la PRL, muy probablemente de origen linfocitario, en la etiología y el curso de ciertas alteraciones del sistema inmunológico como el LEG.

Existe la posibilidad de que la PRL sintetizada y secretada por las CMNP [14, 15] sea exportada a la circulación general [80], sugiriendo acciones locales, autocrinas y paracrinas y más aún, endocrinas de esta hormona sobre el sistema inmunológico. Sin embargo, el papel fisiológico de la PRL de origen linfocitario permanece aún desconocido. Estas observaciones son de especial interés para establecer el significado biológico y los mecanismos responsables del aumento de la síntesis de la PRL por las CMNP de pacientes afectados con LEG.

Los objetivos del presente trabajo incluyeron evaluar de los mecanismos de regulación de la PRL linfocitaria a través de estudiar su respuesta a la administración de un agente antagonista dopaminérgico (metoclopramida), sobre la secreción de la PRL tanto de origen hipofisario como linfocitario, incluyendo el análisis de sus efectos sobre la expresión del gen de la PRL y la secreción de esta hormona en condiciones basales y posteriores al tratamiento con metoclopramida.

HIPÓTESIS

En el lupus eritematoso generalizado, el estado del tono dopaminérgico a nivel central está disminuido, lo que conduce a la elevación moderada de las concentraciones circulantes y/o actividad biológica de la prolactina y probablemente también tenga efecto elevando las concentraciones de la prolactina de origen linfocitario.

Objetivo general

Evaluar la respuesta hipofisaria en términos de la secreción de la prolactina a la administración de un antagonista dopaminérgico en mujeres con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado.

Objetivos específicos

1. Evaluar la secreción de prolactina (PRL) inmunorreactiva y bioactiva en los sueros de mujeres con diagnóstico de LEG (grupo LEG) y de mujeres sanas (grupo control) posterior a la administración de un agente antagonista dopaminérgico, la metoclopramida.
2. Estudiar el perfil electroforético de la PRL en los sueros durante la prueba con metoclopramida y en los medios de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica (CMNP), en condiciones basales y posteriores al estímulo anti-dopaminérgico, en el grupo con LEG y en el grupo control.
3. Cuantificar la PRL secretada por las CMNP mantenidas en cultivo obtenidas en condiciones basales y posteriores al estímulo anti-dopaminérgico en el grupo con LEG y en el grupo control.
4. Analizar la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP mantenidas en cultivo obtenidas en condiciones basales y posteriores al estímulo anti-dopaminérgico en el grupo con LEG y en el grupo control.
5. Estudiar el efecto, en condiciones normales, de la dopamina en la expresión génica de la PRL y el contenido intracelular de AMPc en CMNP en cultivo de un grupo de mujeres sanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. SUJETOS

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

En este estudio se incluyeron 14 pacientes del sexo femenino con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG) y que no padecían alguna enfermedad endocrinológica constituyeron el grupo de estudio. El rango de edad de las pacientes fue de 19 a 39 años. Ninguna paciente recibió tratamiento con corticoesteroides, inmunosupresores o fármacos anti-inflamatorios no esteroides, al menos tres meses antes del estudio. La actividad de la enfermedad se evaluó de acuerdo al índice mexicano de actividad del LEG, MEX-SLEDAI (Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) [83].

Como grupo control se incluyeron 17 mujeres sanas de 22 a 32 años de edad. Ninguna mujer con LEG o control recibía algún fármaco que pudiera afectar los parámetros de la prueba realizada. Todas las mujeres tenían función ovárica normal de acuerdo a la duración de los ciclos menstruales y la fase lútea, además de las cuantificaciones hormonales en suero de estradiol y progesterona determinadas en la fase lútea del ciclo menstrual.

II. DISEÑO EXPERIMENTAL

A las 8:00 am, posterior a un ayuno de 10 a 12 h, se colocó en cada una de las voluntarias un catéter en la vena antecubital, que se mantuvo permeable con solución salina al 0.9%. Después de 30 min de reposo, 10 ml de sangre de cada muestra se obtuvieron a través del catéter, eliminando las primeras 10 gotas de sangre para evitar su dilución en la solución salina. Las muestras obtenidas fueron:

dos basales 0 y 15, y 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de una dosis de 10 mg de metoclopramida por vía oral. Durante el estudio se mantuvo a las donadoras en reposo. Ninguna de las donadoras estudiadas presentó efectos secundarios posteriores a la administración de la metoclopramida.

Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min para separar el suero, que fue almacenado a -20°C hasta las determinaciones hormonales y Western-blot para PRL. Adicionalmente, se colectaron 20 ml de sangre con 1% de EDTA 0.5 M como anticoagulante en el tiempo basal y 90 min posterior al estímulo anti-dopaminérgico de donde se obtuvieron las células mononucleares periféricas (CMNP).

III. MÉTODOS

1. Preparación de las células y cultivo celular

La sangre con anticoagulante se diluyó 1/2 en solución salina al 0.9%. Las CMNP se obtuvieron por gradientes de lymphoprep (Axis Shield, Oslo, Norway) y se lavaron 2 veces con medio RPMI 1640 pH 7.4 (GIBCO, Carlsbad, CA). La viabilidad celular se determinó por tinción con azul tripán y fue mayor a 95% en la población. Las células (1×10^6 células/ml) se cultivaron a una concentración de en medio AIM-V (GIBCO) libre de suero complementado con antibióticos (sulfato de estreptomicina 50 μ g/ml y sulfato de gentamicina USP 10 μ g/ml). El cultivo celular se incubó por 72 h a 37°C, en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂, en ambiente húmedo. Al término de la incubación, los medios de cultivo se separaron de las células por centrifugación a 1000 x g y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

2. Determinaciones hormonales

La PRL inmunorreactiva (PRL-RIA) se cuantificó en los sueros obtenidos en los diferentes tiempos de la prueba de la metoclopramida por radioinmunoanálisis

específico en tubos de borosilicato, utilizando los reactivos amablemente donados por el National Hormone & Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA.). Se utilizó PRL humana altamente purificada (NIDDK-hPRL-I-8) que se marcó con ^{125}I por el método de la cloramina T [84]. La dilución final del anticuerpo anti-PRL humana originado en conejo (NIDDK-anti-hPRL-3) fue 1/400,000. Las muestras se analizaron en dos diferentes diluciones por duplicado y se incubaron con el primer anticuerpo por 18 h y con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en carnero a temperatura ambiente. Posteriormente, se precipitaron los complejos antígeno-anticuerpo añadiendo 0.1 ml de polietilenglicol al 8% y el precipitado se separó por centrifugación a 1,200 x g. La cantidad de radiactividad en los precipitados se cuantificó en un contador para radiaciones gamma (Cobra II, Packard). Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/L}$ de PRL humana con respecto a la preparación estándar de PRL hipofisaria humana RP-2 (NIDDK-hPRL-RP-2). El coeficiente de variación intra e inter-análisis fueron de $\leq 7.0\%$ y $\leq 12.0\%$, respectivamente y la sensibilidad del análisis fue de $1.5 \mu\text{g/L}$. Para evitar la variación inter-análisis a lo largo de la prueba, se procesaron todas las muestras obtenidas de la misma donadora dentro del mismo análisis. Las concentraciones de estradiol y progesterona se determinaron por duplicado por radioinmunoanálisis utilizando estuches comerciales (Diagnostic Products Corporation, USA). El coeficiente de variación intra-análisis para el radioinmunoanálisis de estradiol y progesterona fue de 1.33% y 1.63%, respectivamente.

3. Determinación de la actividad biológica de la PRL

La PRL bioactiva (PRL-BIO) se cuantificó tanto en los sueros obtenidos en los diferentes tiempos de la prueba de la metoclopramida, como en los medios de cultivo de las CMNP, utilizando el bioensayo heterólogo de linfoma Nb2 descrito por Tanaka y col. [18], con ligeras modificaciones. La línea celular Nb2 (donada por el Dr. P. W. Gout, Vancouver, Canadá) es de linfocitos pre-T derivados de linfoma de rata y es dependiente de la PRL para su proliferación. Es un método muy sensible y útil para cuantificar concentraciones de PRL en los medios de cultivo de las CMNP [18], que no son detectadas por el radioinmunoanálisis. Brevemente: las células Nb2 se mantuvieron en medio de mantenimiento (medio Fisher (In Vitro, México), complementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 10% de suero de caballo

(GIBCO), 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol (Sigma Co., St Louis, Missouri, USA), 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina, pH 7.4). Para su arresto en la fase G₀ del ciclo celular, las células (8×10^5 células/ ml) se pre-incubaron en medio de estación (medio Fisher complementado con 1% de suero fetal bovino) durante 24 h. Posteriormente, se reanudó el ciclo celular adicionando dosis crecientes de PRL humana altamente purificada RP-2, que se utilizó como curva estándar, en medio de ensayo (Medio Fisher complementado y libre de suero fetal bovino). Los sueros se analizaron en dos diferentes diluciones por duplicado. Los medios de cultivo de las CMNP incubadas por 72 h se procesaron por duplicado en presencia y ausencia de anticuerpo anti-PRL. En un volumen de 0.2 ml por pozo, se cultivaron 5×10^4 células Nb2 en placas de 96 pozos y se incubaron por 72 h a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂ en ambiente húmedo. Al término de la incubación, se evaluó el efecto de la PRL en la proliferación de las células Nb2 incubando por 18 h con el reactivo colorimétrico XTT (Roche, Mannheim, Germany) y se cuantificó la absorbancia del producto colorido a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Labsystems, Franklin Ma, USA). La sensibilidad del análisis fue de 7.8 pg/ml. Paralelamente, se analizó una curva de PRL en placas de 24 pozos con una concentración celular inicial de 1×10^6 células/ ml y que se incubó en las mismas condiciones. Al final del cultivo, se realizó el conteo celular con azul tripán.

4. Análisis de la heterogeneidad molecular de la PRL linfocitaria

Tanto las muestras de suero como los medios de cultivo de las CMNP se inmunoprecipitaron con la adición de anticuerpo anti-PRL humana (NIDDK-anti-hPRL-IC-5) por 18 h a 4°C, y posteriormente se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo generado en carnero por 18 h a temperatura ambiente. Los precipitados se lavaron con H₂O bidestilada, centrifugando a 1200 x g a 4°C y posteriormente, se disolvieron en solución amortiguadora de Laemmli y se calentaron a 95°C por 5 min. Las muestras se procesaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%, en condiciones reductoras y en solución de corrida (Tris 25mM, Glicina 190mM, 0.1 % SDS), utilizando una cámara de electroforesis Mini-Protean 3 (BIO-RAD, Hercules, CA. USA). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (NENTM, Life

Science Products, Boston, Ma, USA) por electrotransferencia en solución de transferencia (Tris 25mM, Glicina 190mM, 20% metanol), utilizando una cámara de transferencia Mini-Transblot (BIO-RAD, Hercules, CA. USA). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-PRL humana (VLS-2, donado por el Dr YN Sinha, Whittier Institute for Diabetes and Endocrinology, La Jolla, CA, USA) a una dilución final de 1/1,000 en solución TBST (Tris 20mM, NaCl 500mM, 0.5% Tween 20). Los inmunocomplejos se revelaron por autorradiografía posterior a la incubación con Proteína A marcada con ¹²⁵I (200,000 cpm/ ml).

5. Análisis de la expresión del RNAm de la PRL por RT-PCR y Southern-blot

El RNA total se extrajo de las CMNP con el reactivo de trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 1.5 microgramos de RNA total se utilizaron como molde para la síntesis de DNA complementario (DNAc) con la enzima transcriptasa reversa del estuche comercial SuperScript™ First-Strand Syntesis System de RT-PCR (Invitrogen). Posteriormente, el DNAc se amplificó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos que a continuación se describen. Para amplificar un fragmento de 276 pb de PRL, las secuencias de oligonucleótidos fueron: sentido (5') GGGTTCATTACCAAGGCCATC (3'), localizado en el exón 3 del gen de la PRL y anti-sentido (5') TTCAGGATGAACCTGGCTGAC (3'), localizado en parte del exón 4 y parte del exón 5 del gen de la PRL. Para normalizar los fragmentos de PRL, un fragmento del gen constitutivo de la ciclofilina (cic) se amplificó utilizando los siguientes oligonucleótidos: sentido (5') CCCACCGTGTTCTTCGACAT (3') y anti-sentido (5') GCTGGTCTTGCCATTCCTGGA (3'), que amplificaron un fragmento de 451 pb. La amplificación de los fragmentos específicos del DNAc de la PRL y de la cic se efectuó utilizando 5 µl de los productos de reacción de la reversa transcriptasa con 2 UI de Taq DNA polimerasa (Roche) en un volumen final de reacción de 25 µl. La amplificación se efectuó en un termociclador Perkin Elmer 2400. Se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR. Cada ciclo consistió en: la desnaturalización a 94°C por 1 minuto, el alineamiento a 60°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 1 minuto. Agua bidestilada o muestras incubadas en ausencia de transcriptasa reversa se utilizaron como controles negativos de la reacción de RT-PCR.

Las bandas de 276 pb de PRL obtenidas como productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% y se analizaron por Southern-blot utilizando una sonda de PRL marcada con digoxigenina (PRL-DIG). La sonda de PRL-DIG se sintetizó por PCR a partir del plásmido pBR322 con el inserto del DNAc de la PRL humana (donado por la Dra. Nancy Cooke, University of Pennsylvania, Philadelphia), y la sonda de cic-DIG se sintetizó a partir del plásmido pCR2.1 con el inserto del DNAc de la ciclofilina, utilizando el estuche comercial PCR DIG Probe Synthesis (Roche) y los oligonucleótidos descritos previamente. La membrana de nylon con los fragmentos transferidos, se hibridó con la sonda de PRL-DIG en solución estándar de hibridación [SSC 5x, N.laurilsarcosina 0.1%, SDS 0.02% y reactivo de bloqueo al 1% (Roche)] durante 18 h a 65°C. Al término de la incubación, la membrana se lavó con diferentes soluciones y se incubó con solución de bloqueo 1x (Roche). Posteriormente, la membrana se incubó con anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1/10,000 en solución de bloqueo 1x (Roche). Después de diversos lavados, la membrana se incubó con el revelador CDP-Star (Roche), que es un sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina. Finalmente, la membrana se expuso en una película radiográfica lumini-film chemiluminescent detection film (Roche). La densitometría de las bandas obtenidas se midió en el analizador de imágenes Eagle Eye (Stratagene).

6. Cultivo de CMNP estimuladas *in vitro*

Para evaluar factores que pudieran estar implicados en la regulación de la síntesis de la PRL linfocitaria, CMNP obtenidas de donadoras sanas en edad reproductiva se cultivaron en medio libre de sueros AIM-V (GIBCO) complementado con antibióticos (sulfato de estreptomicina 50 µg/ml y sulfato de gentamicina USP 10 µg/ml), 50 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma), como inhibidor de las fosfodiesterasas, en presencia o ausencia de: dopamina, 8 Br-AMPC (Sigma), dopamina (Sigma) o IL-2 (Roche). Las células se incubaron por 18 h a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂ en ambiente húmedo para evaluar la expresión del gen de la PRL. Las células se cultivaron en botellas de cultivo de 25 cm² (Costar, New York, USA) para evaluar el RNAm de la PRL y por triplicado en placas de 24 pozos (Costar) para la determinación del contenido de AMPC intracelular. Al término de la incubación, las células se homogeneizaron y se separó un volumen de suspensión celular para la

determinación de AMPc por radioinmunoanálisis específico. Estas células se lisaron con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% Nonidet P-40, una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche)), posteriormente, los lisados se calentaron a 95°C por 5 minutos para inactivar a las fosfodiesterasas y se almacenaron a -80°C para su posterior tratamiento. Parte de los lisados se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Bradford. El resto de las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 1,000 x g y posteriormente se prepararon para la extracción de RNA total.

7. Radioinmunoanálisis de AMPc

La determinación de la concentración intracelular de AMPc se llevó a cabo por radioinmunoanálisis específico de la siguiente manera: 2.5 µg de TME-sAMPc (2'-O-monosuccinyladenosine 3'5'-cyclic monophosphate tyrosyl methyl ester, Sigma) se marcaron con ¹²⁵I por el método de cloramina T [84]. El AMPc marcado se purificó por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de DEAE celulosa. 0.5 ml tanto de las dosis de la curva estándar como las muestras se acetilaron con 20 µl de una mezcla de trietilamina y anhídrido acético (2:1). Las muestras se analizaron en dos diferentes diluciones por duplicado. Se utilizó anticuerpo anti-AMPc (Calbiochem, Darmstadt, Germany) diluido 1/3,000 de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial. Los tubos con las mezclas se incubaron por 18 h a 4°C. Al término de la incubación, se adicionó a las muestras 1 ml de etanol 96° frío e inmediatamente se centrifugaron a 1,200 x g por 30 minutos a 4°C. Se cuantificó la radioactividad de los precipitados en un contador para radiaciones gamma (Cobra II, Packard). Los resultados se expresaron como pmol de AMPc/mg de proteína. Los coeficiente de variación intra e inter-análisis fueron de ≤5% y ≤10%, respectivamente.

8. Análisis estadístico

Las áreas bajo la curva durante la prueba de metoclopramida se calcularon con el programa computacional Sigma Stat (Jandel, San Rafael, CA, USA). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas utilizando la prueba de análisis de varianza de

una vía, seguida de la prueba de t de student o Mann Whitney, dependiendo de la distribución de los datos. Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Características clínicas de los sujetos

Las características clínicas, así como los valores hormonales de la población estudiada se muestran en la tabla 1. No se observaron diferencias significativas en la edad o en el índice de masa corporal entre los grupos control y LEG. El valor de la media de las concentraciones circulantes de estradiol en el grupo LEG estuvo dentro del rango normal observado durante la fase folicular temprana del ciclo menstrual y similar a la observada en el grupo control. Las concentraciones basales de PRL inmunorreactiva (PRL-RIA) y de PRL bioactiva (PRL-BIO), así como la relación BIO/RIA en el grupo LEG fueron similares al grupo control. La actividad clínica de la enfermedad fue evaluada de acuerdo al índice MEX-SLEDAI en una escala de 0 a 32 puntos. En tres pacientes la enfermedad se calificó mayor a 2 puntos, que fue considerada como enfermedad activa.

Tabla 1 Características clínicas y hormonales en mujeres control (CON) y con LEG

	CON (n = 17)	LEG (n = 14)
Edad (años)	27.8 ± 6.1	31.5 ± 6.0
IMC (kg/m ²)	24.7 ± 3.3	24.7 ± 3.1
E ₂ (pg/ml)	47.6 ± 19.6	50.9 ± 35.2
PRL-RIA (µg/L)	11.1 ± 3.4	10.8 ± 5.6
PRL-BIO (µg/L)	13.3 ± 6.6	14.6 ± 6.3
PRL-B/I	1.2 ± 0.5	1.5 ± 0.5
MEX-SLEDAI > 2	-	3

Media ± DE; IMC: índice de masa corporal; E₂: estradiol; PRL-B/I: relación PRL-BIO/RIA

La identidad inmunológica de la PRL en el suero de las mujeres de ambos grupos, control y LEG, se analizó utilizando diferentes diluciones de las muestras. Para esta finalidad, diferentes volúmenes de las muestras se estudiaron en presencia del anticuerpo anti-hPRL, lo que resultó en la generación de curvas de desplazamiento paralelas comparadas tanto, con los sueros obtenidos en ambos grupos (grupo control, $m=1.88$, grupo LEG $m=1.83$), como con la preparación estándar (hPRL-RP-2, $m=1.86$). Estos resultados indican que la PRL en las muestras es detectada por el anticuerpo de manera similar, independientemente del origen de las mismas (Fig. 4). Asimismo, la actividad biológica de la PRL fue evaluada en muestras de suero a diferentes diluciones utilizando la línea celular Nb2. De manera similar a lo observado con la inmunorreactividad, las curvas de proliferación celular resultaron paralelas, sugiriendo propiedades biológicas similares de la PRL en las diferentes muestras estudiadas.

2. Efectos de la administración de metoclopramida en las concentraciones de PRL en suero

La administración de metoclopramida por vía oral a las mujeres de ambos grupos, control y LEG, indujo la elevación de las concentraciones en suero de la PRL-RIA y la PRL-BIO a los 30 min posteriores a su administración, y significativamente mayores a los 60, 90 y 120 min (Fig. 5). La respuesta, en términos de la PRL-RIA, en las mujeres con LEG fue mayor que en las mujeres del grupo control, siendo estadísticamente significativo a los 90 min posteriores a la administración de la metoclopramida (Fig. 5-A). En términos de la PRL-BIO, la respuesta también fue significativamente mayor en el grupo LEG a los 90 min y se mantuvo elevada hasta los 120 min (Fig. 5-C). La media del área bajo la curva (ABC) de la respuesta de PRL-RIA a la metoclopramida tuvo una tendencia a ser mayor en el grupo LEG (Fig.

5-B) y fue significativamente mayor en el caso de la PRL-BIO (Fig. 5-D).

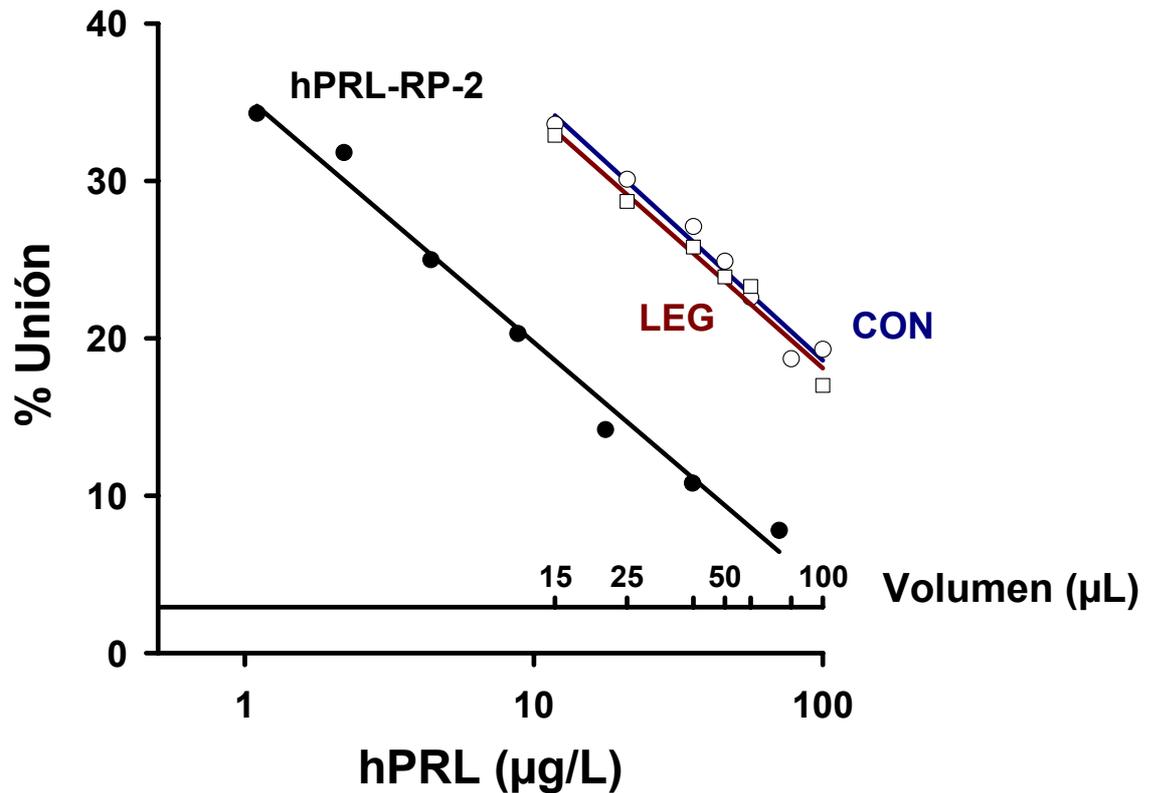


Fig. 4 Curvas dosis-respuesta lineal del desplazamiento de ^{125}I -PRL unida a anticuerpo anti-PRL-3 por sueros del grupo control (CON) y del grupo LEG. Diferentes volúmenes de los sueros se analizaron por radioinmunoanálisis en presencia de anticuerpo anti-hPRL-3, conservando el paralelismo entre los grupos y con respecto al estándar internacional hPRL-RP-2.

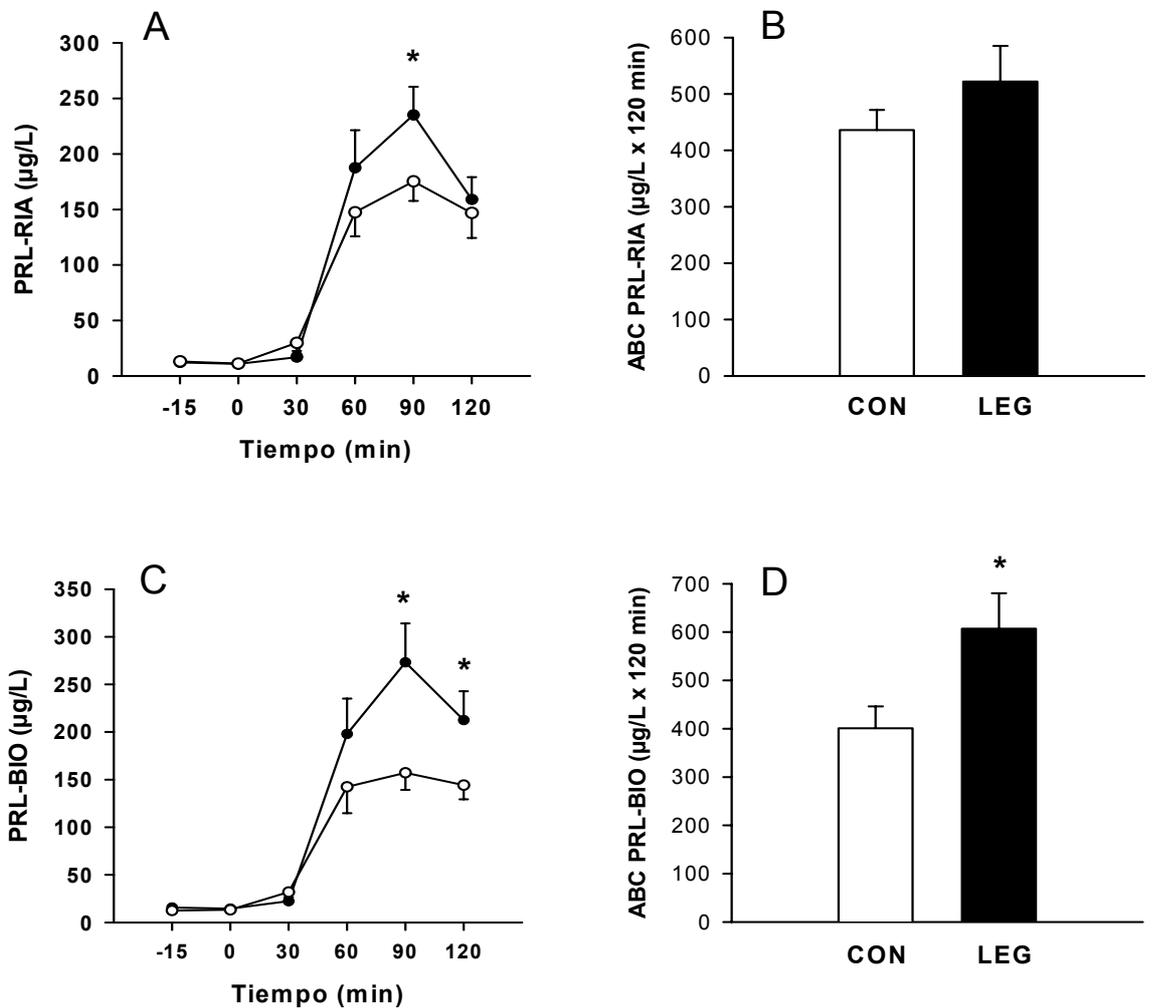


Fig. 5 Efecto temporal de la administración de 10 mg de metoclopramida en las concentraciones de PRL determinadas por radioinmunoanálisis (PRL-RIA) (panel A) y por bioactividad (PRL-BIO) (panel C) en el grupo control (—○—) y el grupo LEG (—●—). Área bajo la curva (ABC) de las respuestas de PRL-RIA (panel B) y de PRL-BIO (panel D) del grupo control (CON) y del grupo LEG. Los puntos o barras representan la media \pm EE de los valores de cada grupo. * $P < 0.05$ vs control.

La relación BIO/RIA de la respuesta de PRL a lo largo de la prueba del antagonista dopaminérgico no fue estadísticamente diferente entre los grupos (Fig. 6), lo que implica el patrón de isoformas de la PRL secretada es similar en ambos grupos.

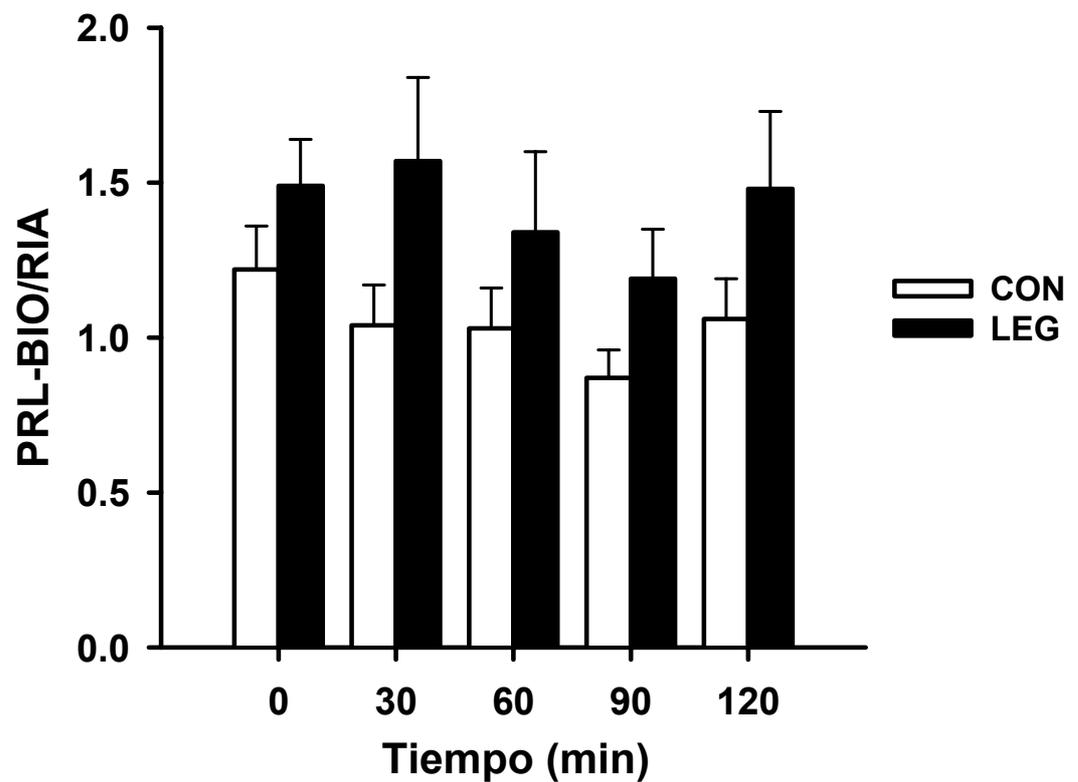


Fig. 6 Relación bioactividad/inmunorreactividad de las concentraciones de PRL (PRL-BIO/RIA) circulante durante la prueba de metoclopramida en el grupo control (CON) y el grupo con LEG. Las barras representan la media \pm EE de los valores de cada grupo. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

3. Prolactina linfocitaria

La secreción de la PRL por las células mononucleares periféricas (CMNP) mantenidas en cultivo obtenidas tanto en condiciones basales (0 min), como a los 90 min de la administración del antagonista dopaminérgico, se determinó por el bioensayo Nb2. En la Fig. 7 se puede observar la respuesta de la proliferación celular dependiente de la dosis de PRL tanto en términos de conteo celular con azul tripán, como de la conversión de un sustrato de una deshidrogenasa mitocondrial (XTT) a un producto colorido que se midió por absorbancia. Todas las muestras se analizaron en presencia o ausencia de anticuerpo anti-PRL humana a una dilución de 1/10,000. La presencia del anticuerpo inhibió completamente el efecto de diferentes dosis de PRL (7.8 – 250 ng/L) en la proliferación celular (Fig. 8).

El valor de la media de las concentraciones basales de la PRL secretada fue significativamente mayor en medios de cultivo de las CMNP del grupo LEG que la obtenida en el grupo control (Fig. 9). El bloqueo dopaminérgico en el grupo control resultó en el aumento significativo de la PRL linfocitaria secretada al medio de cultivo, mientras que en el grupo LEG, no se observaron cambios significativos con respecto a la secreción basal (Fig. 9). Los cambios observados no se debieron a modificaciones en la concentración celular a lo largo del cultivo.

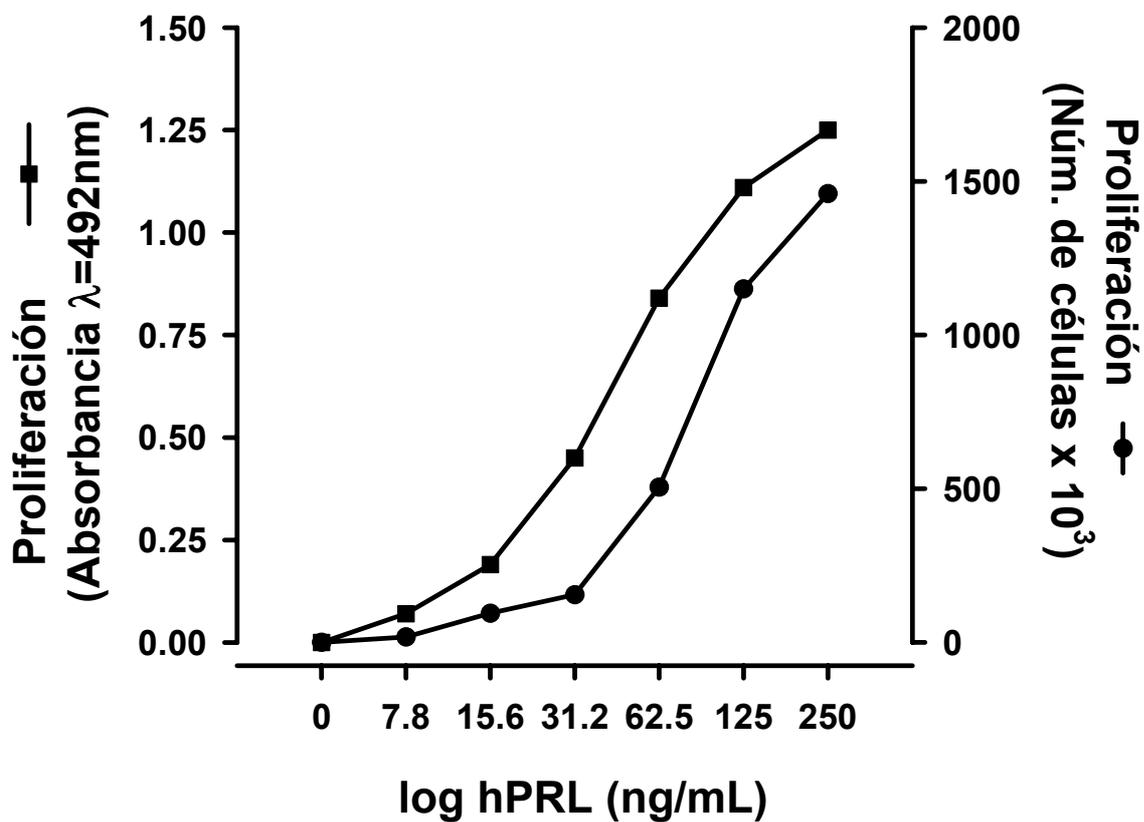


Fig. 7 Proliferación de la línea celular de linfocitos T de rata Nb2 en presencia de diferentes concentraciones de PRL humana (hPRL). La estimulación de la proliferación inducida por la PRL se cuantificó tanto, en términos de número de células viables como, de la conversión de un sustrato de una deshidrogenasa mitocondrial (XTT) cuyo producto colorido se midió por absorbancia.

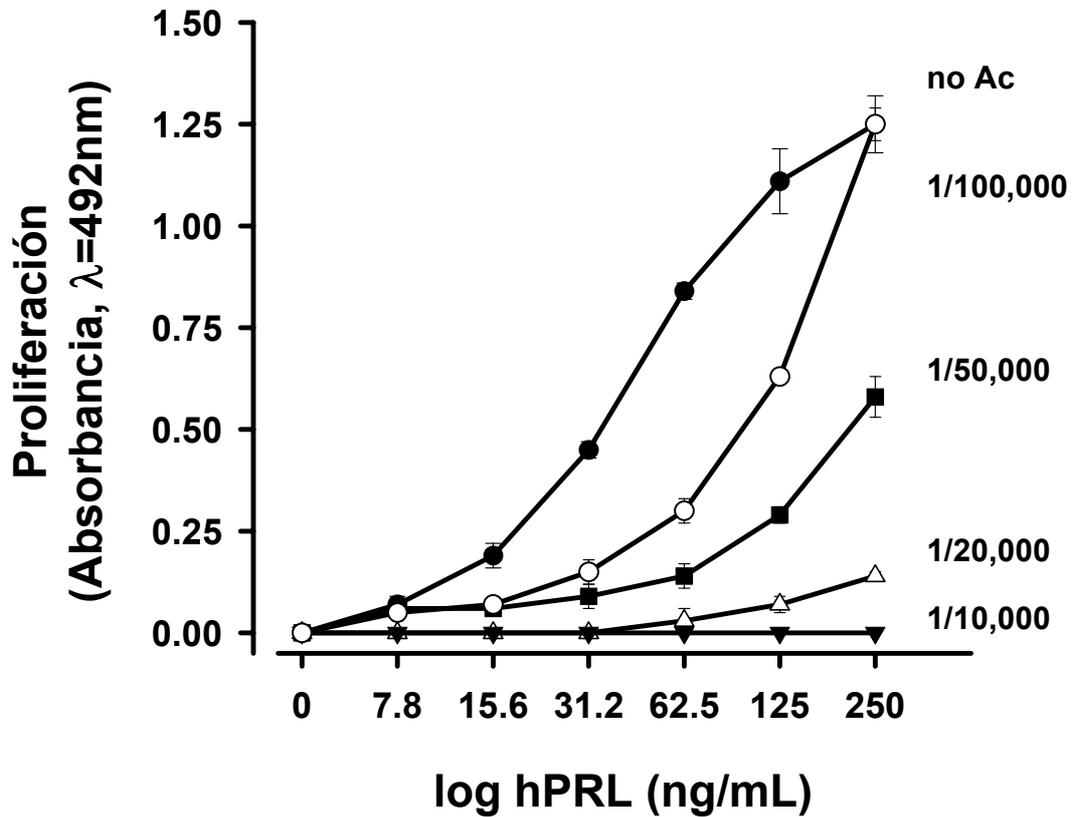


Fig. 8 Efecto del anticuerpo anti-hPRL-3 en la proliferación de la línea celular de linfocitos T de rata Nb2 estimulada por la PRL humana (hPRL). La presencia de diferentes diluciones de anticuerpo anti-hPRL-3 bloqueó el efecto en la proliferación inducida por la PRL en ausencia de anticuerpo (no Ac), siendo la dilución 1/10,000 la más efectiva. La proliferación se cuantificó por la absorbancia del producto colorido de la conversión del reactivo XTT.

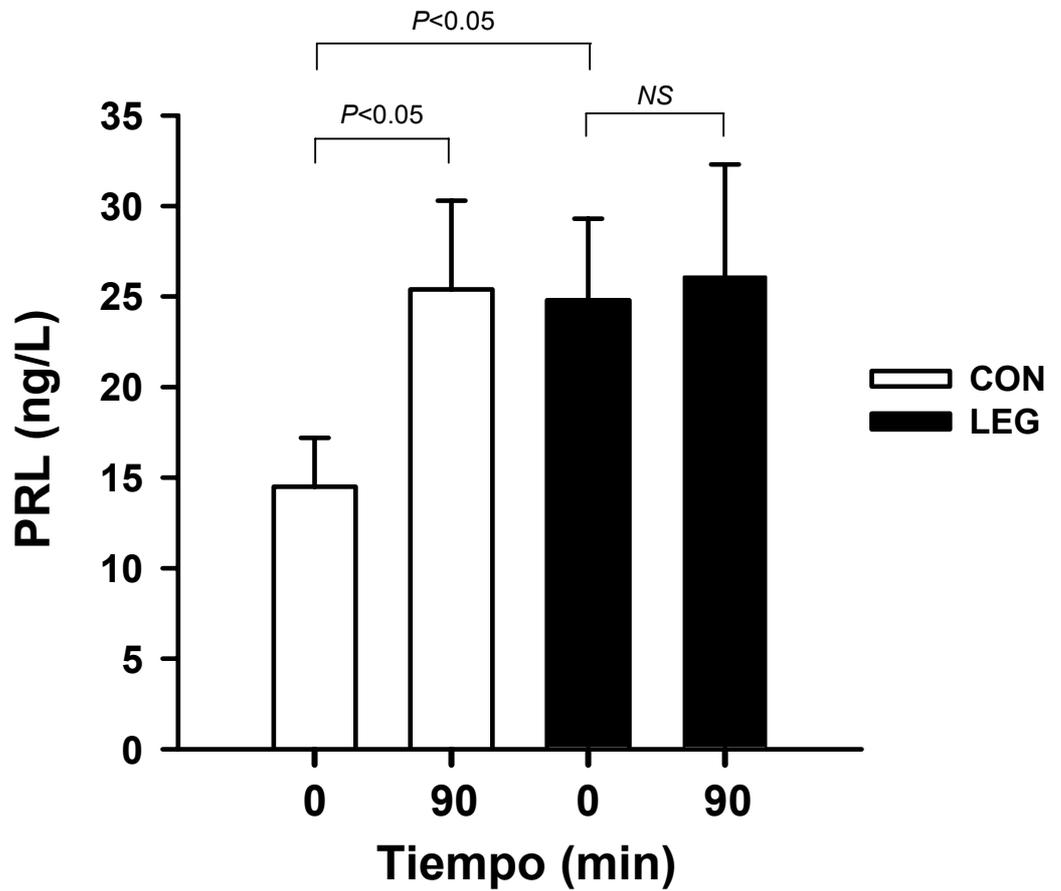


Fig. 9 Secreción de PRL al medio de cultivo de las CMNP obtenidas del grupo control (CON) y del grupo con LEG en condiciones basales (0) y 90 min posteriores al estímulo anti-dopaminérgico. Las barras representan la media \pm EE. NS = no significativo

Para evaluar diferencias en la concentración de células viables entre los grupos celulares, se tomó una alícuota por duplicado de 0.15 ml de cada botella de cultivo y se incubaron en placas de 96 pozos, en presencia del reactivo XTT durante 6 h. Posteriormente, se cuantificó la absorbancia en los pozos y no observándose diferencias significativas entre las células obtenidas de los grupos control y LEG, tanto en condiciones basales como estimuladas (Fig. 10). Por otra parte, el cultivo de CMNP respondió al estímulo mitogénico de concanavalina A, utilizado como control de funcionalidad de las células y evaluado con el reactivo XTT (Fig. 11).

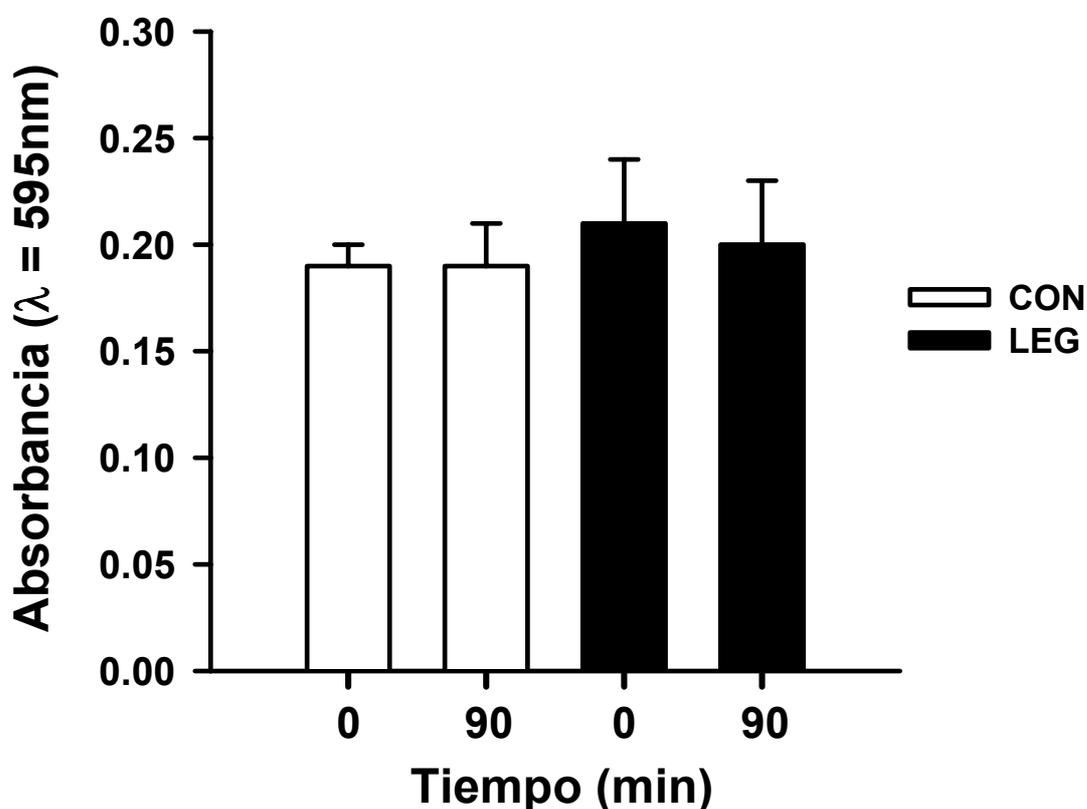


Fig. 10 Absorbancia del producto colorido de la conversión del reactivo XTT por las CMNP mantenidas en cultivo durante 72 h. La condición del LEG o la estimulación con la metoclopramida no modificaron la concentración de células viables en el cultivo. Las barras representan la media \pm EE. No hubo diferencias significativas entre los grupos celulares.

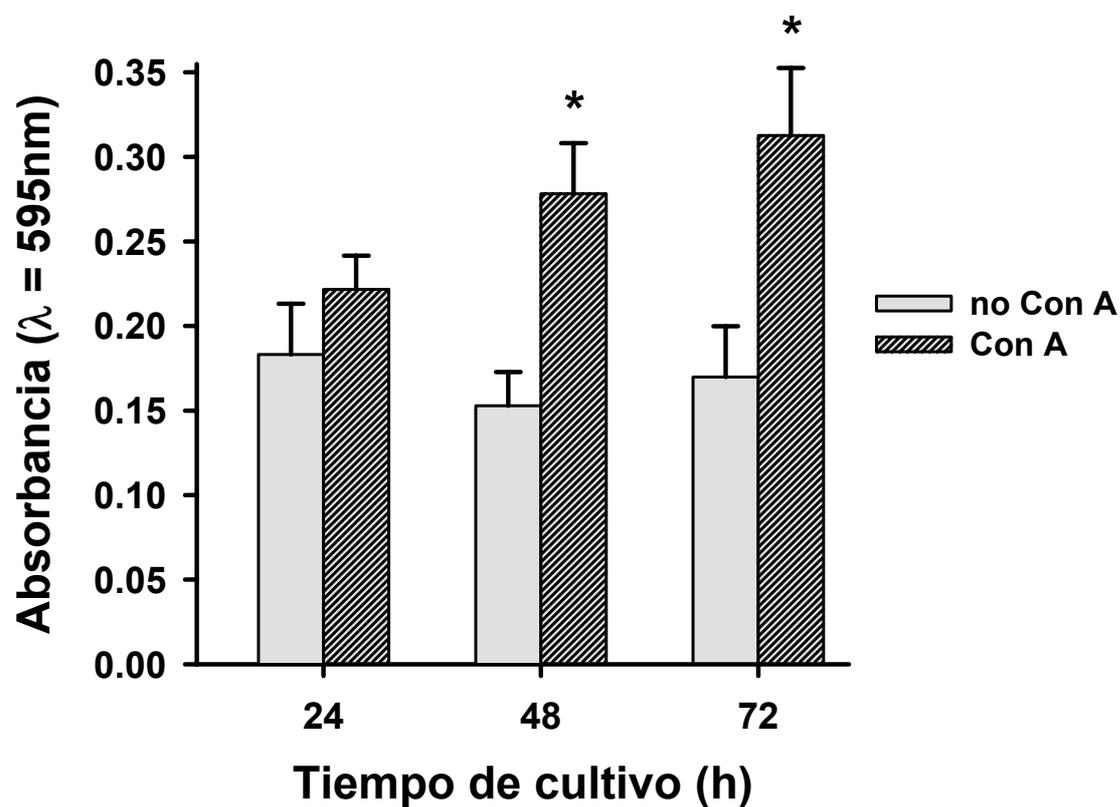


Fig. 11 Proliferación de las CMNP del grupo control estimuladas con concanavalina A (Con A) durante 24, 48 y 72 h. La concentración celular en ausencia de Con A (no Con A) no se modificó de manera significativa a lo largo del cultivo, mientras que la presencia de Con A estimuló significativamente la proliferación de las células. Las barras representan la media \pm EE, n= 5. *P < 0.05 vs no Con A

4. Análisis de la heterogeneidad molecular de la PRL

La presencia de las diferentes formas moleculares de la PRL se analizó en los sueros a lo largo de la prueba de la metoclopramida, así como en los medios de cultivo de las CMNP obtenidas en condiciones basales y 90 min posteriores al estímulo anti-dopaminérgico (Fig. 12). En los sueros, en condiciones basales (0 min), obtenidos del grupo control y LEG, se observaron dos bandas específicas con pesos moleculares aparentes de 23 y 60 kDa (Fig. 12-A). En los medios de cultivo de las CMNP obtenidas en condiciones basales se observó la presencia de una sola banda correspondiente a una isoforma de PRL con peso molecular aparente de 60 kDa (Fig. 12- B). Esta banda se encontró presente, tanto en los sueros como en los medios de cultivo, en mayor proporción en el grupo LEG que en el grupo control (Fig. 12-A y B). En ambos grupos, la administración de metoclopramida no indujo cambios en la distribución de las isoformas moleculares de la PRL en cada donadora (Fig. 12-A y B).

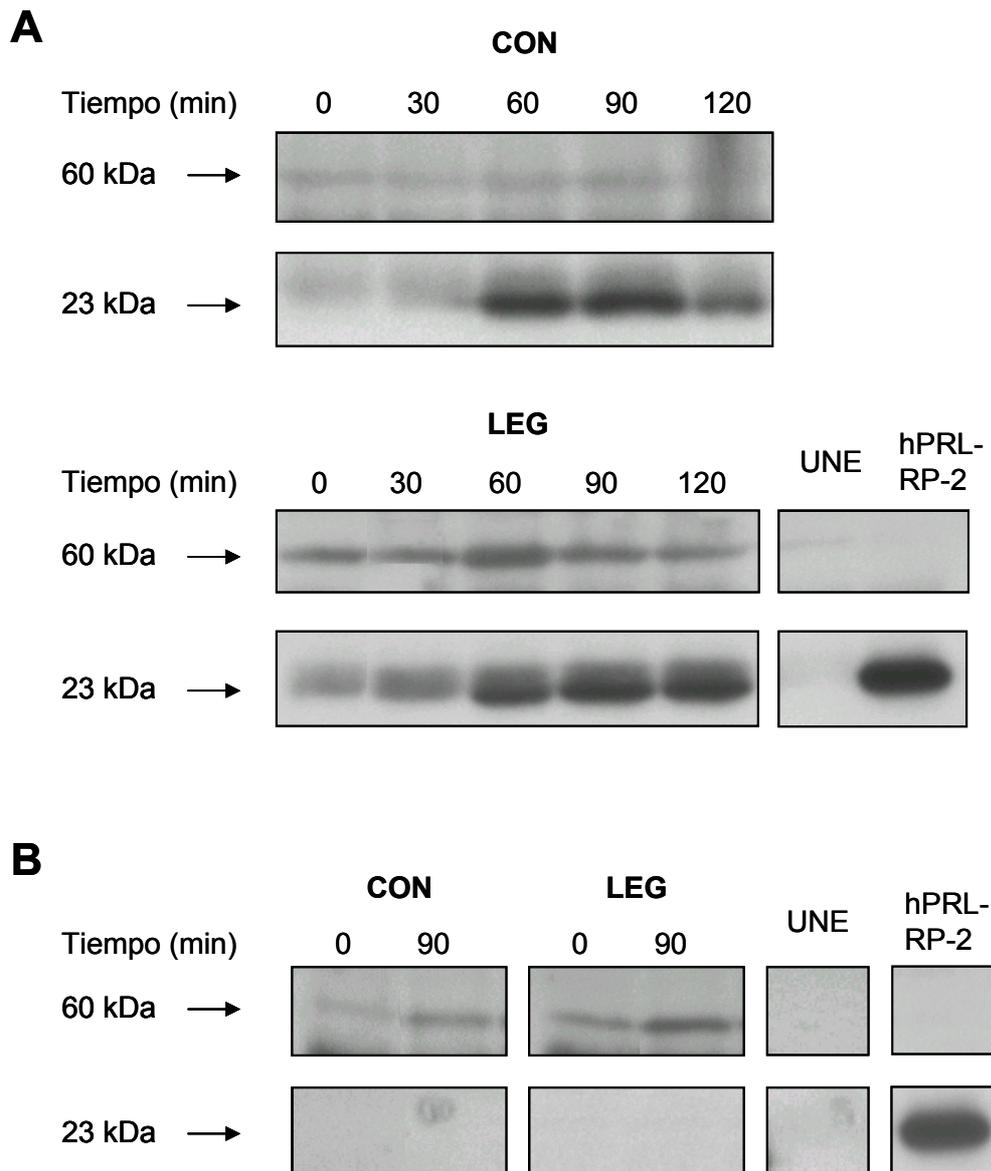


Fig. 12 Análisis de las formas moleculares de PRL por Western-blot. Muestras de suero (panel A) en el tiempo basal (0) y en los diferentes tiempos (min) después de la administración de la metoclopramida, y de medios de cultivo de las CMNP (panel B) obtenidas en los tiempos 0 y 90 min de la prueba fueron analizadas. Las muestras obtenidas del grupo control (CON) y del grupo LEG se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-PRL previo al corrimiento electroforético. UNE = uniones no específicas de la inmunoprecipitación; hPRL-RP-2 = estándar de PRL hipofisaria humana altamente purificada.

Los valores relativos de la isoforma de 23 kDa presente en el suero aumentaron a través del tiempo en ambos grupos (Fig. 12-A). Como control positivo se utilizó el estándar de PRL hipofisaria humana altamente purificada RP-2 (NIDDK-hPRL-RP-2). El análisis de esta preparación mostró la presencia de una sola banda con peso molecular aparente de 23 kDa (Fig. 12-A y B). Como control negativo, se utilizó solución amortiguadora de fosfatos PBS 0.1M en ausencia de suero o medio de cultivo y en presencia del primer y segundo anticuerpos.

5. Análisis de la expresión del RNAm de la PRL

Debido a que la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP es baja, ésta se analizó por el método de RT-PCR y Southern-blot. El RNA total se extrajo de las CMNP obtenidas de ambos grupos tanto en condiciones basales (0 min), como a los 90 min posteriores al estímulo anti-dopaminérgico y mantenidas en cultivo. El RNA total se utilizó como molde para sintetizar el DNAc y posteriormente se amplificó por PCR (RT-PCR) utilizando los iniciadores descritos en la sección de material y métodos. El producto de PCR de las muestras de ambos grupos resultó en una banda específica de la talla esperada de 276 pb (Fig. 13-A). El valor de la media de las densitometrías relativas de las bandas específicas de PRL se comparó en ambos grupos, y se observó que en condiciones basales fue mayor en las muestras del grupo LEG que en las muestras del grupo control (Fig. 13-B). La expresión del RNAm de la PRL en las CMNP obtenidas a los 90 min de la administración del antagonista dopaminérgico fue significativamente mayor que en aquéllas obtenidas en condiciones basales. En las CMNP del grupo LEG, la expresión del RNAm no se modificó por la metoclopramida.

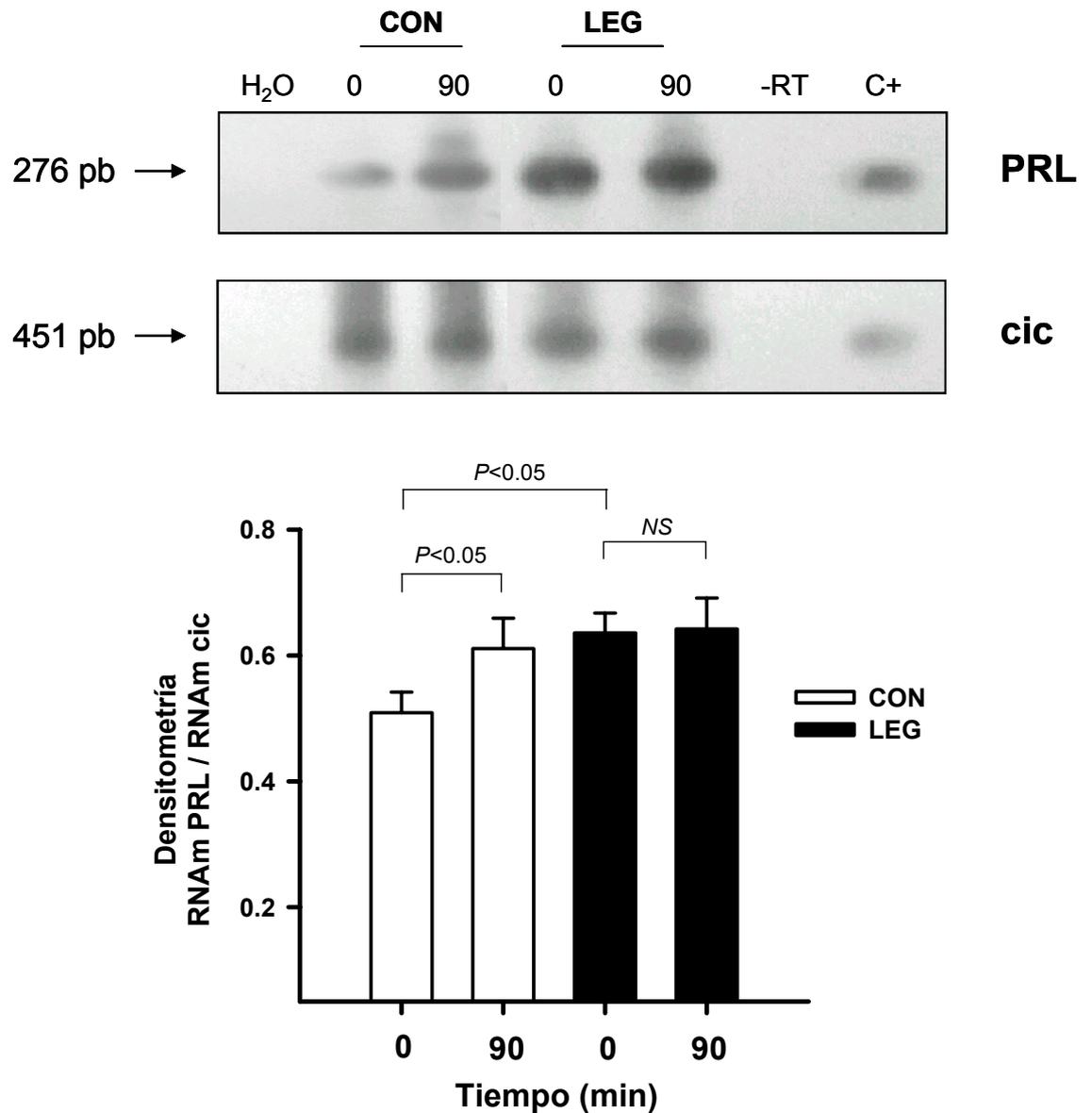


Fig. 13 Análisis de la expresión del RNAm de la PRL por RT-PCR y Southern-blot en CMNP mantenidas en cultivo obtenidas en el tiempo basal (0) y 90 min después de la administración de la metoclopramida. En la figura se muestran los productos del RT-PCR representativos del grupo control (CON) y del grupo LEG. Las reacciones en ausencia de molde (H₂O) o de enzima transcriptasa reversa (-RT) se utilizaron como controles negativos. La gráfica representa la normalización de la densitometría relativa de las bandas de PRL con respecto a las de ciclofilina (cic). Las barras representan la media \pm DE. C+ = sonda específica de PRL o ciclofilina.

6. Efecto de activadores de la vía del AMPc en la expresión del RNAm de la PRL

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la posible participación de la dopamina en la regulación de la síntesis de la PRL linfocitaria. Dado que las CMNP del grupo control obtenidas posterior al estímulo anti-dopaminérgico *in vivo* y que fueron mantenidas en cultivo, expresaron mayor RNAm que aquéllas células obtenidas en condiciones basales, se decidió estudiar la regulación de la expresión del gen de la PRL en CMNP estimuladas *in vitro* en presencia de dopamina. Diversos estudios realizados en cultivos de CMNP, líneas celulares y cultivos primarios de linfocitos T han demostrado que el AMPc es un importante estimulador de la expresión de la PRL, y ligandos como la prostaglandina E₂ inducen la expresión de la PRL, a través de la vía del AMPc [36, 85, 86]. Además, como ya se describió en la introducción, la unión de la dopamina a receptores del tipo D1 y D2 activa mecanismos de señalización que resultan en cambios en el contenido intracelular de AMPc [7, 29].

Inicialmente, se estudiaron los efectos de un análogo no hidrolizable del AMPc en la transcripción del gen de la PRL. Para esta finalidad, CMNP obtenidas de un nuevo grupo de mujeres sanas en edad reproductiva se incubaron en presencia de 8-Br-AMPc en las condiciones descritas en material y métodos. Un fragmento de 629 pb del RNAm de la PRL se amplificó por RT-PCR, se hibridó con una sonda específica y el producto se identificó por Southern-blot. La incubación durante 18 h de las CMNP con diferentes dosis de 8 Br-AMPc indujo el aumento de la abundancia relativa del RNAm de la PRL (Fig. 14). La respuesta fue variable, dependiendo de cada donadora e incrementado desde 1.5 hasta 4 veces en presencia de 2mM de 8-Br-AMPc. Asimismo, la incubación de las CMNP con diferentes dosis de toxina del cólera (activador de proteínas G estimuladoras) y de

forskolina (activador de la adenilato ciclasa) estimuló positivamente la expresión del RNAm de la PRL (Fig. 15).

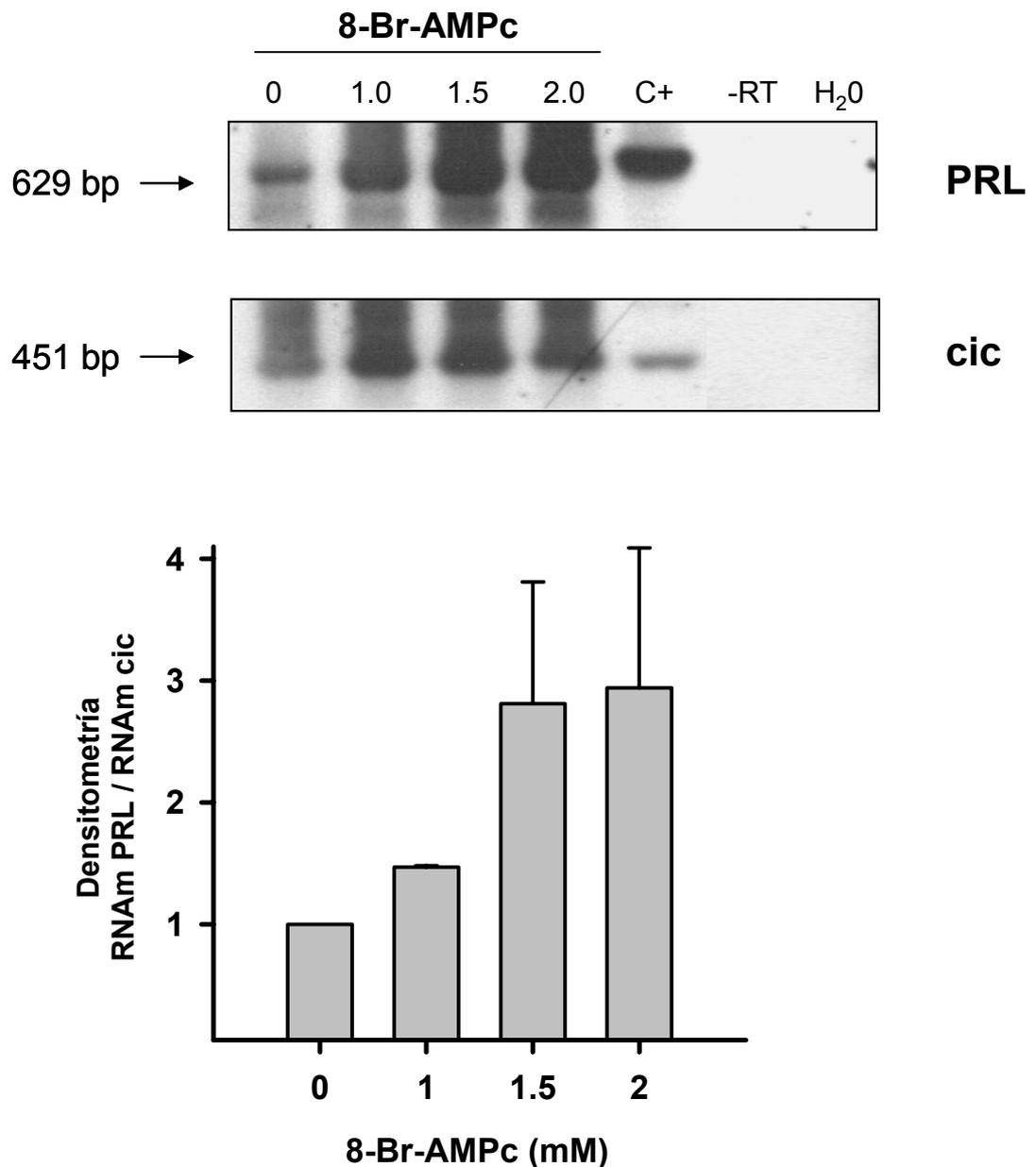


Fig. 14 Efecto de la estimulación por 8-Br-AMPC en la expresión del RNAm de la PRL en CMNP mantenidas en cultivo. La expresión se evaluó por RT-PCR y Southern-blot. En la figura se muestran las bandas de los productos del PCR representativas de las células incubadas en presencia de diferentes dosis de dopamina. Las leyendas están descritas en la figura 12. Las barras representan la media de la densitometría \pm DE de tres experimentos realizados en CMNP de tres donadoras distintas.

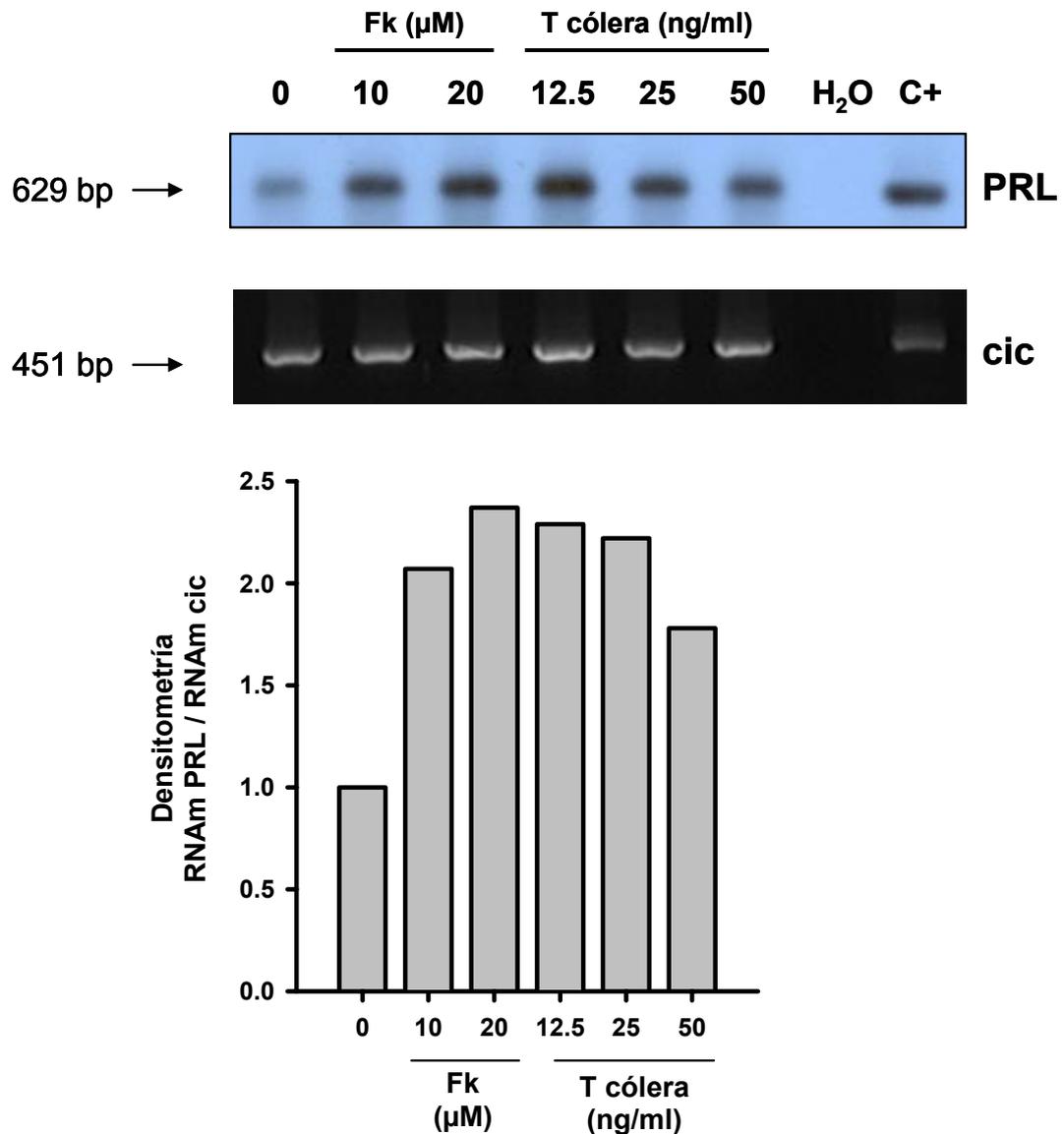


Fig. 15 Efecto de la estimulación por forskolina (Fk) o toxina del cólera (T cólera) en la expresión del RNAm de la PRL en CMNP mantenidas en cultivo. La expresión se evaluó por RT-PCR y Southern-blot. En la figura se muestran las bandas de los productos del PCR representativos de las células incubadas en presencia de diferentes dosis de Fk o T cólera. Las leyendas están descritas en la figura 12. Las barras representan la densitometría relativa de las bandas de PRL normalizada contra la de cic.

7. Efecto de la dopamina en el contenido intracelular de AMPc y en la expresión del RNAm de la PRL

Debido a que la dopamina inhibe la secreción de citocinas y el contenido intracelular de AMPc en linfocitos humanos [39, 43], se procedió a estudiar el efecto de la estimulación con dopamina tanto en la generación de AMPc, como en la expresión del RNAm de la PRL en CMNP de mujeres sanas mantenidas en cultivo. Las CMNP se cultivaron durante 18 h en presencia de diferentes concentraciones de dopamina (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M). Al término de la incubación las células se lisaron con solución RIPA y en el lisado se determinó el contenido intracelular de AMPc por radioinmunoanálisis específico. La estimulación de las células con dopamina inhibió de manera dependiente de la dosis la acumulación de AMPc intracelular, siendo significativamente diferente en presencia de 10^{-9} y 10^{-7} M de dopamina (Fig. 16). Los resultados se normalizaron cuantificando las concentraciones de proteína total en los pozos de cultivo y se expresaron como la media \pm EE de 8 diferentes experimentos, realizados por triplicado. Los resultados demostraron que la incubación en presencia de dopamina inhibió de manera dosis-dependiente la expresión del RNAm de la PRL en 5 de las sujetos (Fig. 17), la estimuló en 4 y no la modificó en 1 (Fig. 18).

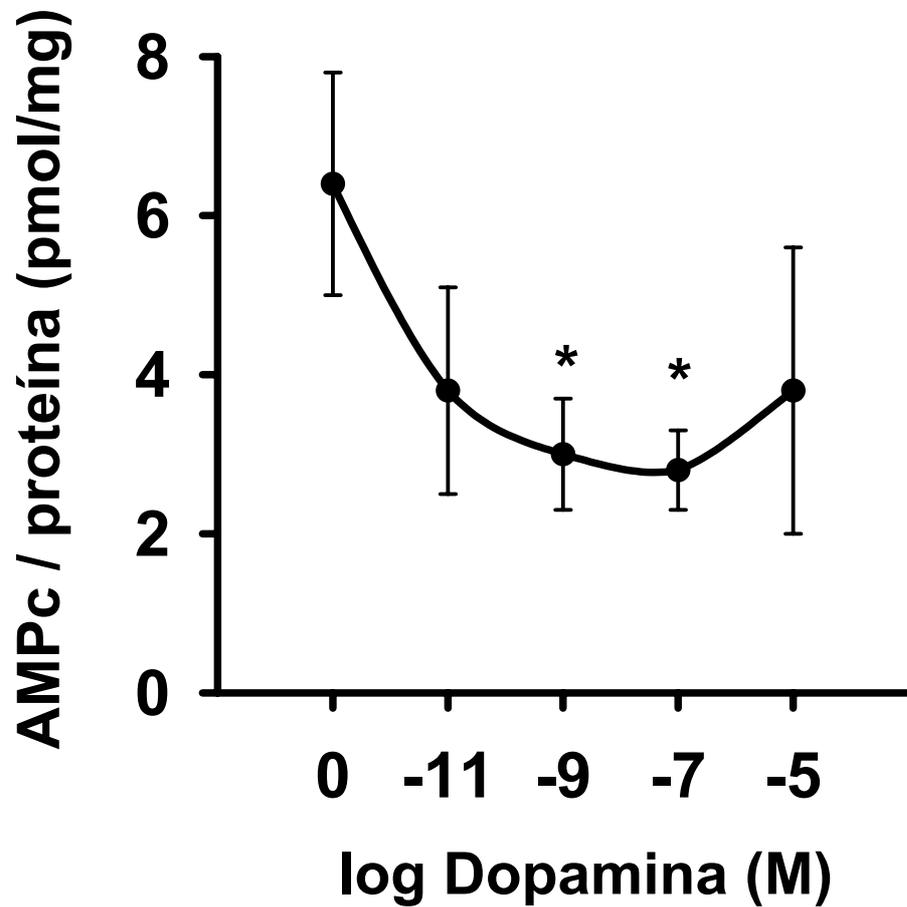


Fig. 16 Efecto de la inhibición por dopamina en el contenido intracelular de AMPc en las CMNP mantenidas en cultivo. El AMPc se cuantificó por RIA específico. Los resultados están expresados como la media + EE de 8 experimentos, * P < 0.05 vs 0 M dopamina.

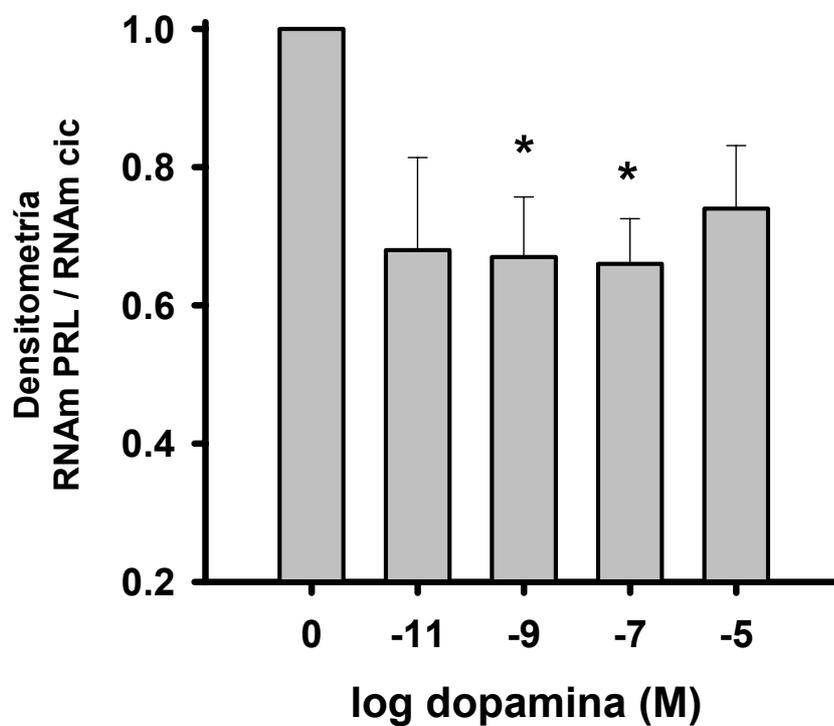
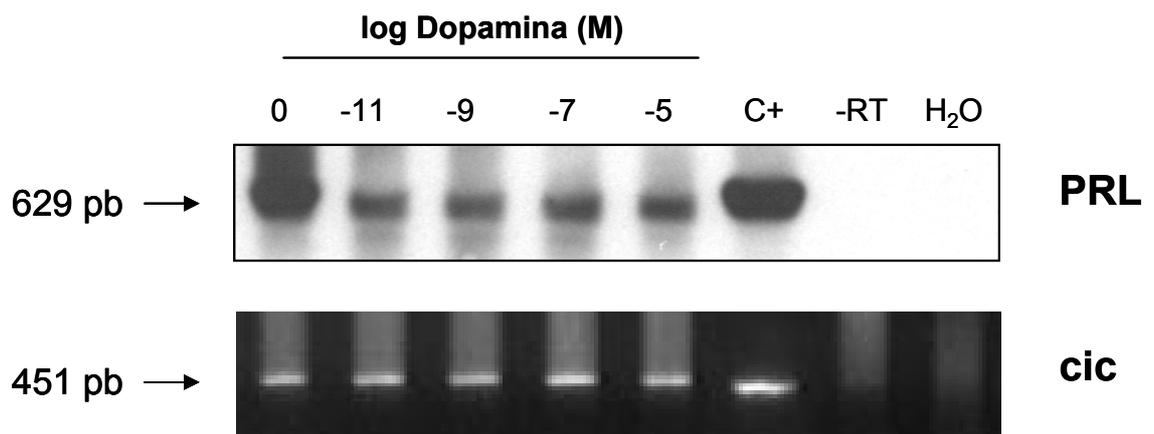


Fig. 17 Efecto de la inhibición por dopamina en la expresión del RNAm de la PRL en CMNP mantenidas en cultivo. La expresión se evaluó por RT-PCR y Southern-blot. En la figura se muestran las bandas de los productos del PCR representativos de las células incubadas en presencia de diferentes dosis de dopamina. Las leyendas están descritas en la figura 12. Las barras representan la media de la densitometría \pm EE de diferentes experimentos realizados en CMNP de cinco donadoras.

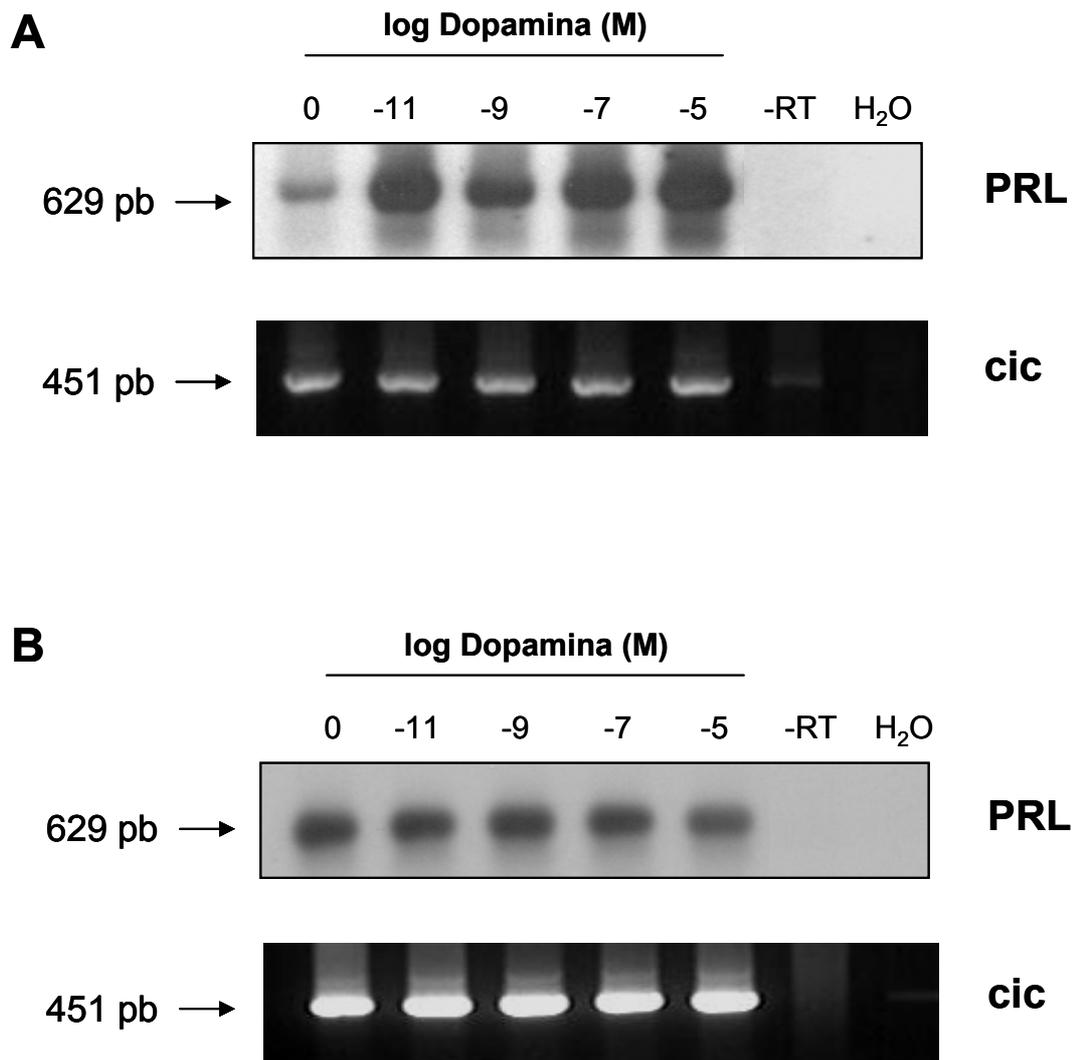


Fig. 18 Efecto de la dopamina en la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP mantenidas en cultivo. La expresión se evaluó por RT-PCR y Southern-blot. En la figura se muestran la respuesta representativa a la estimulación con dopamina (panel A) y la respuesta nula a la dopamina (panel B) en las células de dos donadoras diferentes. El efecto de la dopamina mostrado en el panel A fue similar en tres donadoras y el efecto mostrado en el panel B también se repitió en tres donadoras. Las leyendas están descritas en la figura 12.

8. Efecto de la IL-2 en el contenido intracelular de AMPc y en la expresión del RNAm de la PRL

En células Jurkat de linfocitos T humanos, la actividad transcripcional del promotor alternativo de la PRL es inducida por fitohemaglutinina y ésteres del forbol, como el PMA, [36]. Estos activadores ejercen sus acciones a través de la activación de cinasas de tirosina y de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente, y representan dos vías independientes del AMPc. Con el objeto de conocer los efectos de IL-2, que actúa a través de la activación de cinasas de tirosina y de PKC, en la expresión del gen de la PRL, decidimos evaluar los efectos de IL-2 en las CMNP mantenidas en cultivo. Para esta finalidad, se utilizaron diferentes concentraciones de IL-2 (5, 10, 20, 40 U/ml), que se conoce inducen la proliferación de los linfocitos, y que en las CMNP promovieron el crecimiento celular como se observa en la figura 19. Los resultados del AMPc normalizados con las concentraciones de proteína total se expresaron como la media \pm EE de 7 experimentos diferentes. Los resultados demostraron que la IL-2 produjo un efecto inhibitorio en la expresión del gen de la PRL (Fig. 20). Por otra parte, como se muestra en la figura 21, la incubación de las CMNP con IL-2 no modificó, de manera significativa, el contenido intracelular de AMPc.

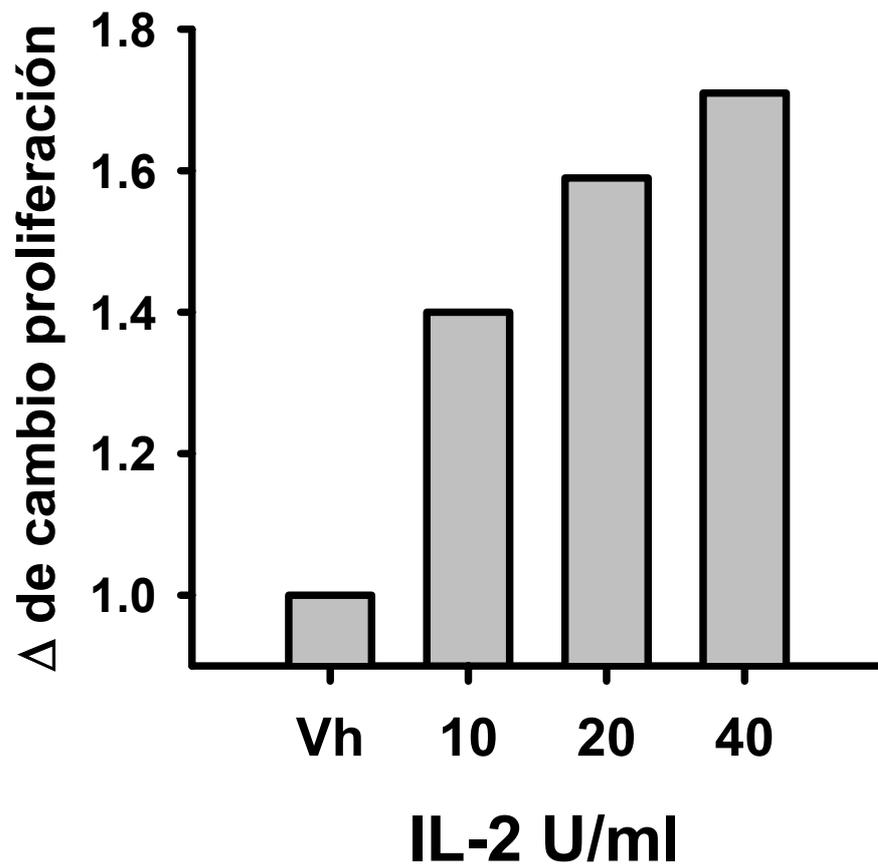


Fig. 19 Efecto de la IL-2 en la proliferación de las CMNP mantenidas en cultivo. La incubación con diferentes concentraciones de IL-2 estimuló la proliferación celular cuantificada por la absorbancia del producto colorido de la conversión del reactivo XTT.

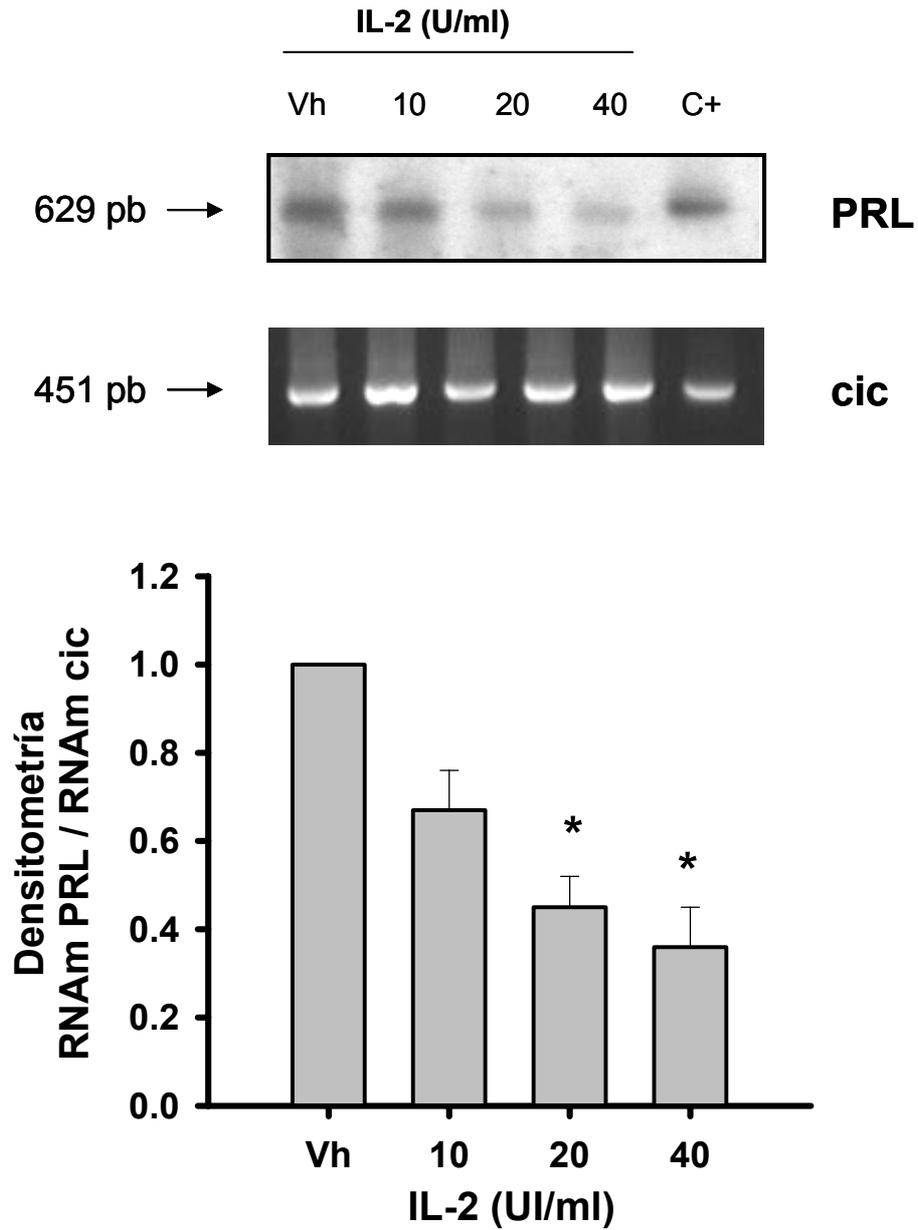


Fig. 20 Efecto de la inhibición por IL-2 en la expresión del RNAm de la PRL en CMNP mantenidas en cultivo. La expresión se evaluó por RT-PCR y Southern-blot. En la figura se muestran las bandas de los productos del PCR representativos de las células incubadas en presencia de diferentes dosis de dopamina. Las leyendas están descritas en la figura 12. Las barras representan la media de la densitometría \pm EE de diferentes experimentos realizados en CMNP de cinco donadoras.

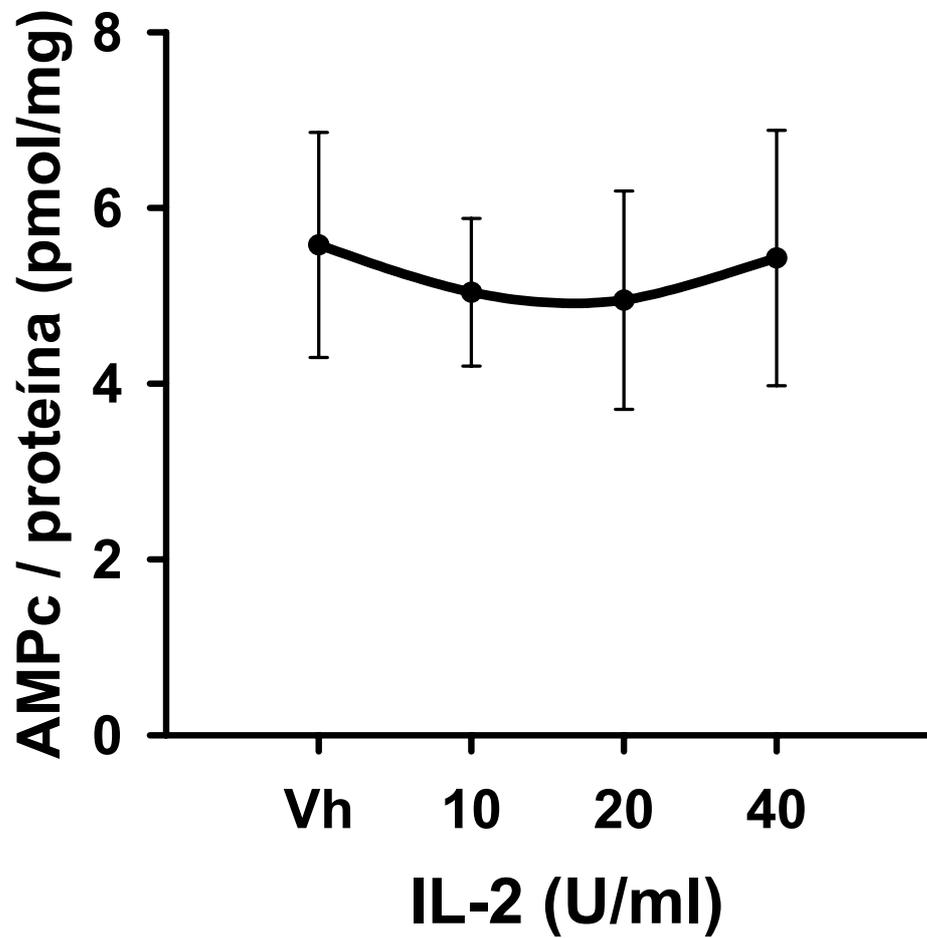


Fig. 21 Efecto de la IL-2 en el contenido intracelular de AMPc en las CMNP mantenidas en cultivo. El AMPc se cuantificó por RIA específico. La incubación con diferentes dosis de IL-2 no modificó las concentraciones de AMPc en las CMNP. Los resultados están expresados como la media + EE de 7 experimentos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el estado del tono dopaminérgico hipotalámico en un grupo de mujeres en edad reproductiva con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG). Los resultados demostraron que la respuesta a la administración *in vivo* de un agente antagonista dopaminérgico fue mayor, en términos de la secreción hipofisaria de prolactina (PRL) en el grupo LEG. Debido a que la PRL circulante humana es estructuralmente heterogénea [3], tanto la PRL inmunorreactiva, como la bioactiva fueron cuantificadas, siendo más evidente la respuesta en la PRL bioactiva, pero sin observarse diferencias en el patrón de isoformas de PRL secretadas en ambos grupos. Además, la PRL secretada por las células mononucleares de sangre periférica (CMNP) del grupo LEG, en condiciones basales, secretaron más PRL que las células del grupo control, como se había descrito previamente [15, 79]. Este comportamiento también se observó en la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP mantenidas en cultivo. Además, en las CMNP obtenidas posterior al bloqueo dopaminérgico, la expresión y la secreción de PRL fue mayor con respecto a las células obtenidas en condiciones basales sólo en el grupo control, mientras que en el grupo LEG, no se observaron cambios significativos con respecto a la secreción basal.

La respuesta hipofisaria en términos de la secreción de PRL a la administración de un agente anti-dopaminérgico ha sido de utilidad para evaluar el grado de activación del sistema dopaminérgico o tono dopaminérgico a nivel hipotalámico [25-27, 87-90]. A mayor respuesta al agente anti-dopaminérgico, mayor es el tono y viceversa. De esta manera, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que en el grupo experimental, el tono dopaminérgico hipotalámico se encontró aumentado en comparación con el tono observado en el grupo control. Las concentraciones circulantes de PRL posterior a la

administración de la metoclopramida pueden estar influenciadas por diversos factores, tales como diferentes concentraciones basales de PRL circulante, el mayor peso corporal en los individuos o el efecto directo de los estrógenos en la hipófisis [91-93]. Sin embargo, en ambos grupos estudiados estos parámetros no fueron significativamente diferentes (Tabla 1), por lo que inferimos que la mayor respuesta fue debida a la presencia del LEG.

El mecanismo responsable del aumento en las concentraciones de PRL circulante en el LEG no se ha esclarecido hasta la fecha. Sin embargo se ha informado, que las concentraciones de ácido homovanílico en plasma, que es uno de los principales metabolitos de la dopamina, se encuentran disminuidas en sujetos con LEG [94], lo que sugiere que en estos pacientes el tono de la dopamina se encuentre disminuido y por lo tanto, la secreción de la PRL por la hipófisis sea mayor. Los hallazgos del presente estudio difieren de esta suposición, lo que puede explicarse dado que las concentraciones circulantes de ácido homovanílico reflejan principalmente el metabolismo de la dopamina a nivel periférico y no son demostrativas de lo que ocurre a nivel del sistema nervioso central [7, 95]. Por otra parte, el aumento en las concentraciones de 16 alfa-hidroxiestrone observadas en el suero de pacientes con LEG [96], pudiera explicar al aumento en las concentraciones de PRL circulante como resultado del efecto estrogénico a nivel hipofisario.

En un estudio utilizando ratas hipofisectomizadas, se ha propuesto que la PRL sintetizada en sitios extrahipofisarios puede ser exportada a la circulación general en cantidades fisiológicamente significativas y ser capaz de mantener las funciones biológicas importantes, supliendo a la PRL de origen hipofisario [80]. En condiciones normales, las células del sistema inmunológico sintetizan PRL [13-15, 48, 97, 98]. Tanto estudios previos, como el presente demuestran que CMNP de pacientes con LEG sintetizan y secretan mayores concentraciones de PRL [15, 79]. Esta característica está presente no sólo en el LEG, sino también en

otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide [66, 67, 99], sin que hasta la fecha se conozcan los mecanismos implicados en el aumento en la tasa de expresión y síntesis de la PRL linfocitaria. Como se mostró en este estudio, tanto la cantidad de PRL basal, como la expresión del RNAm de la PRL fueron significativamente más elevadas en las CMNP del grupo LEG. Dado que la PRL extrahipofisaria es exportada a la circulación, es posible que la PRL derivada de los linfocitos contribuya al aumento en las concentraciones de la PRL en el LEG. En el grupo con LEG estudiado, las concentraciones de PRL circulante fueron normales, similares a las del grupo control. De tal forma que, probablemente los linfocitos como fuente de PRL, estén participando en las concentraciones de PRL en la circulación periférica, y que el aumento en la secreción de esta citocina por los linfocitos sea detectado por el hipotálamo teniendo impacto a nivel central a través de aumentar el tono dopaminérgico con la finalidad de normalizar las concentraciones circulantes de la hormona. De manera similar, en el eje hipotálamo-hipofisario, la PRL regula su propia secreción actuando en el sistema dopaminérgico hipotalámico, en un mecanismo de “retroalimentación de asa corta” (Fig. 2), que es el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis de la PRL [7]. En este sentido, diversos estudios han establecido que el aumento de la PRL endógena o exógena resulta en mayor actividad de las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas, secretoras de dopamina [7]. Además, el hallazgo en este estudio de la forma molecular de 60 kDa de la PRL que se observa como especie única en los medios de cultivo de las CMNP y en los sueros de ambos grupos, pero estuvo ausente en una preparación estándar de PRL de extractos hipofisarios, sugiere que esta isoforma es derivada de las células linfocitarias y que pudiera contribuir a las concentraciones de la PRL en la circulación. Estas observaciones no descartan la presencia de alteraciones en los mecanismos de retroalimentación en el eje hipotálamo-hipófisis que promuevan la secreción inadecuada de PRL (hiperprolactinemia) o bien, que sea secundaria al aumento de la PRL inducida por citocinas a nivel hipofisario [100].

La presencia de normoprolactinemia en el grupo LEG en conjunto con el hallazgo del tono dopaminérgico aumentado, indican que la dopamina de origen central endógena es fisiológicamente efectiva en la supresión de la secreción de PRL a nivel hipofisario. Sin embargo, a nivel linfocitario aparentemente esto no sucede. Una observación interesante en este estudio fue la mayor expresión del RNAm y secreción de la PRL posterior al estímulo anti-dopaminérgico en las CMNP del grupo control, pero no en el grupo con LEG. Este hallazgo no era esperado, dado que la síntesis de la PRL en las células linfoides no es dependiente del factor de transcripción Pit-1, como en la hipófisis, y se ha planteado que no es modulada por los reguladores clásicos de la PRL hipofisaria [33, 101]. Estos resultados sugieren la posible participación del sistema dopaminérgico en la regulación de la PRL linfocitaria en condiciones fisiológicas normales y que podría estar modificada en el LEG.

El efecto de la dopamina en la regulación de la síntesis y la secreción de la PRL hipofisaria ha sido ampliamente documentada [1, 2, 7, 29, 32]. En contraste, los mecanismos implicados en el control de la PRL en tejidos extrahipofisarios son poco conocidos. La decidua placentaria ha sido el sistema celular mejor estudiado en relación a los factores implicados en la regulación de la síntesis de la PRL extrahipofisaria. En este tejido, la PRL es modulada por factores autocrinos y paracrinos de la unidad feto-placentaria, como la progesterona, la insulina, la IL-1 y la IL-2, mientras que los reguladores clásicos de la PRL hipofisaria como la dopamina y la TRH no modifican su secreción [7, 102, 103]. En los linfocitos, los reguladores conocidos de la síntesis de la PRL hipofisaria como los estrógenos, el VIP, la TRH no modifican la expresión del gen de la PRL, mientras que un agonista de receptores D2 de la dopamina, la bromocriptina, inhiben cerca del 20% la expresión de este gen [101]. Por el contrario, la dexametasona [101], y la ciclosporina [36] inhiben y el ácido retinoico estimula la expresión de la PRL linfocitaria [101], siendo alguna de estas acciones observadas también en la hipófisis [104]. El estudio de los factores y las vías de transducción implicados

en el control de la síntesis y secreción de la PRL cobra relevancia, dado que las moléculas producidas localmente modulan las funciones del propio sistema inmunológico. La regulación diferencial de estas moléculas puede conducir a la diversidad en la tasa de síntesis y ésta a su vez, generar variabilidad en las respuestas biológicas. La dopamina, el principal regulador de la síntesis y secreción de la PRL hipofisaria, no ha sido estudiado como un factor implicado en el control de la PRL linfocitaria, aún cuando el tratamiento con agonistas dopaminérgicos en pacientes con LEG reduce la actividad de la enfermedad [105]. El promotor alternativo de la PRL es activado por análogos del AMPc y por la proteína cinasa A, debido a la presencia de secuencias de elementos de respuesta a AMPc o CRE a lo largo de este promotor [6, 35, 36]. Por tanto, ligandos naturales que activen la vía dependiente de este segundo mensajero pudieran estar implicados en el control de la PRL en tejidos extrahipofisarios. La dopamina es el inhibidor más importante de la síntesis de la PRL hipofisaria y sus acciones son mediadas por la disminución del contenido intracelular de AMPc, cuyo efecto primario se encuentra localizado a nivel de la regulación de la actividad transcripcional de Pit-1 [7]. En el sistema inmunológico, la dopamina participa en la proliferación y diferenciación celular e inhibe la secreción de algunas citocinas, como la IL-2, la IL-4 y el IFN- γ [37, 43, 106]. De hecho, los linfocitos expresan receptores de dopamina de los tipos D1 y D2 [39, 98, 107]. Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que la dopamina afecta la expresión del gen de la PRL en las CMNP mantenidas en cultivo.

En el modelo experimental utilizado de CMNP en cultivo, la adición de un análogo no hidrolizable del AMPc, el 8 Br-AMPc aumentó la densitometría relativa del RNAm de la PRL evaluada por RT-PCR y Southern-blot. Asimismo, la dopamina inhibió el contenido intracelular de AMPc y modificó, en un efecto dual, la densitometría relativa de los productos de transcripción de la PRL. Estos resultados sugieren que la dopamina pudiera actuar como un ligando natural en la regulación de la

expresión génica de la PRL linfocitaria a través de la inhibición del segundo mensajero AMPc.

La regulación de la transcripción depende tanto de los receptores expresados como del ambiente intracelular, lo que está directamente relacionado con los factores de transcripción presentes en la célula, que dirigen específicamente la expresión del gen de la PRL [34]. Estudios previos han demostrado que el efecto de análogos del AMPc así como activadores de la proteína cinasa C pueden ser diversos tanto en magnitud como en el tipo de respuesta [108, 109]. Estas divergencias pueden deberse al sistema celular, ya sea que se trate de líneas celulares linfocitarias o cultivo primario, o también depender del donador [108, 109]. Se ha encontrado, por ejemplo, que en CMNP mantenidas en cultivo, la respuesta en términos de la expresión del gen de la PRL puede ser de 2 hasta 30 veces, y que la incubación con un activador de la proteína cinasa C, el PMA, puede inducir el aumento en la expresión de la PRL en la línea de células Jurkat o bien inhibirla en el cultivo primario de CMNP [36, 108]. Además el PMA puede inhibir el efecto producido por el análogo del AMPc o tener efecto sinérgico con él y esto posiblemente dependa de la utilización de diferentes señales que regulen la transcripción del gen de la PRL, el tipo celular, o bien del estado de activación de la células que pueda estar influenciado por infecciones subclínicas o estados de alergia [36, 85, 86, 108]. Estudios de Kooijman y colaboradores demostraron que la inhibición de la p38 MAPK abate la expresión de la PRL inducida por el AMPc y que su fosforilación ocurre independientemente de la activación de la PKA, por lo que concluyen que la inducción de la expresión de la PRL en los linfocitos T se lleva a cabo por la cooperación de dos diferentes vías de señalización: una dependiente y otra independiente de la PKA [85]. El efecto estimulador de la dopamina que observamos en las células de cuatro donadoras, pudiera explicarse a través de la unión a receptores D1 y la posible participación de p38 MAPK, una de las vías de señalización que queda por estudiar.

Los efectos de la dopamina en las CMNP se llevan a cabo interviniendo a nivel de la expresión génica de la PRL y seguramente a través de la unión a receptores de la familia D2 que están acoplados a proteínas G inhibitorias, inhibiendo la vía dependiente de AMPc y de la PKA, y finalmente inhibiendo la expresión del gen. La expresión y secreción aumentadas de la PRL linfocitaria en los pacientes con LEG pueda deberse a alteraciones en los mecanismos de regulación de la PRL que pudieran involucrar a las proteínas CRE. La falta de efecto de la metoclopramida en las células del grupo con LEG apoya esta suposición, lo que no se debe a la falta de capacidad de las células de responder en términos de la expresión y secreción de la PRL, ya que las células de estos pacientes pueden responder a activadores como la Concanavalina A (datos no mostrados). Dado que diversos estudios proponen el uso de agonistas de la dopamina como una alternativa en la terapia de enfermedades autoinmunes [81, 105, 110], quedan por estudiar los mecanismos de regulación involucrados en la síntesis de la PRL de origen linfocitario en los estados como el LEG. El tratamiento con concentraciones de PRL como en estados de hiperprolactinemia, induce el rompimiento de la tolerancia e induce estados parecidos al lupus sólo en ratones con susceptibilidad genética [110]. La manipulación de las concentraciones de PRL circulante o más específicamente, de la que proviene de los linfocitos, podrían proporcionar opciones terapéuticas para aquella cohorte de pacientes con LEG que cursan con hiperprolactinemia.

Por otra parte, la deficiencia de IL-2 en pacientes con LEG y en modelos de roedores con LEG ha sido descrita previamente [111]. En los linfocitos, la IL-2 promueve la activación y la proliferación celular. El receptor para la IL-2 está presente en los linfocitos T y B y en los monocitos. En células en reposo o no activadas, altas dosis de IL-2 inducen la proliferación a través del dímero $\beta\gamma$ de su receptor, mientras que en células activadas lo hace a través del trímero $\alpha\beta\gamma$ [112]. En modelos knockout para la IL-2 o para el receptor de IL-2 α se presenta

el desarrollo de enfermedades autoinmunes, mientras que el tratamiento con IL-2 lo previene [111]. La deficiencia en la producción de IL-2 en los linfocitos de pacientes con LEG se ha observado en estudios *in vitro*, atribuyendo esta disminución a la represión del promotor de la IL-2 por parte del factor de transcripción CREM [113, 114]. En este estudio, las CMNP mantenidas en cultivo fueron incubadas en presencia de IL-2 como un control de funcionalidad celular en el que se evaluó la proliferación celular en cada bioensayo. Diferentes dosis de IL-2 estimularon el crecimiento celular, sin embargo inhibieron significativamente la densitometría relativa del RNAm de la PRL en las CMNP. Esta citocina ejerce sus acciones en las células blanco uniéndose a receptores específicos que modifican la actividad de cinasas de tirosina, independientemente de la producción de AMPc. De hecho, la incubación de las CMNP con IL-2 no modificó en el contenido intracelular de AMPc. Estos datos refuerzan la suposición de que otras vías de señalización pueden estar involucradas en la regulación de la PRL de origen linfocitario. La deficiente producción de IL-2 en los linfocitos de pacientes con LEG sugiere que esta citocina pueda tener un papel en la regulación de la PRL linfocitaria y que en estados autoinmunes como el LEG, la disminución en la síntesis de IL-2 sea un factor responsable del aumento en la tasa de síntesis de la PRL a nivel del sistema inmunológico. Queda por estudiar el efecto de la IL-2 en la expresión de la PRL en los linfocitos de pacientes con LEG y correlacionar las concentraciones de IL-2 en células mantenidas en cultivo, con dicha expresión.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren la desregulación de los mecanismos que controlan la expresión del gen de la PRL en células del sistema inmunológico de pacientes con LEG, contribuyendo de esta manera al incremento de las concentraciones circulantes de la PRL y por tanto, de la actividad del sistema dopaminérgico a nivel hipotalámico como un mecanismo adaptativo para mantener las concentraciones fisiológicas de la PRL en la circulación.

CONCLUSIONES

1. El estado del tono dopaminérgico a nivel central está aumentado en pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG), cuyas concentraciones de PRL en la circulación son normales.
2. Los resultados del presente estudio sugieren que la prolactina (PRL) de origen linfocitario contribuye al aumento en la actividad del sistema dopaminérgico hipotalámico en el LEG, como un mecanismo adaptativo con el propósito de mantener las concentraciones de PRL circulante dentro del rango fisiológico.
3. El aumento del tono dopaminérgico en el LEG es probablemente secundario a cambios en la regulación de la síntesis y secreción de la PRL linfocitaria.
4. La presencia de concentraciones elevadas de la PRL secretada por los linfocitos en condiciones basales y la falta de efecto de la metoclopramida indican la presencia de alteraciones en los mecanismos de regulación en el LEG.
5. El aumento en la secreción y en la expresión del gen de la PRL de origen linfocitario, bajo la estimulación con metoclopramida en el grupo control, sugiere la participación de la dopamina en los mecanismos de regulación de la síntesis de la PRL en el sistema inmunológico.
6. La dopamina y la IL-2 son candidatos a participar en la regulación de la PRL linfocitaria a través de mecanismos dependientes e independientes de la vía del AMPc.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Neill JM, Nagy GM** 1994 Prolactin secretion and its control. In: Knobil E NJ (ed) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd, New York, pp 1833-1860
2. **Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, et al.** 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-69
3. **Sinha YN** 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16:354-69
4. **Truong AT, Duez C, Belayew A, et al.** 1984 Isolation and characterization of the human prolactin gene. *Embo J* 3:429-37
5. **Hiraoka Y, Tatsumi K, Shiozawa M, et al.** 1991 A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 75:71-80
6. **Berwaer M, Martial JA, Davis JR** 1994 Characterization of an upstream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol* 8:635-42
7. **Ben-Jonathan N, Hnasko R** 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724-63
8. **Larrea F, Mendez I, Escorza A, et al.** 1992 Prolactin size variants during pregnancy in women with ovulatory hyperprolactinemia: characterization by isoelectric focusing and lectin affinity chromatography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 44:91-100
9. **Larrea F, Mendez I, Parra A, et al.** 1993 Serum pattern of different molecular forms of prolactin during normal human pregnancy. *Hum Reprod* 8:1617-22
10. **Cohen H, Cohen O, Gagnon J** 1994 Serum prolactin-binding protein (PRL-BP) of human and rat are identified as IgG. *C R Acad Sci III* 317:293-8
11. **Heffner LJ, Gramates LS, Yuan RW** 1989 A glycosylated prolactin species is covalently bound to immunoglobulin in human amniotic fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 165:299-305
12. **Leanos-Miranda A, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F** 2001 Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:866-75
13. **Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, et al.** 1992 Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol Endocrinol* 6:1023-31
14. **Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, et al.** 1992 Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7713-6
15. **Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, et al.** 1997 A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3664-9
16. **Inaudi P, Reymond MJ, Rey F, et al.** 1992 Pulsatile secretion of gonadotropins and prolactin during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle: analysis of instantaneous secretion rate and secretory concomitance. *Fertil Steril* 58:51-9

17. **Sinha YN, Selby FW, Lewis UJ, et al.** 1973 A homologous radioimmunoassay for human prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 36:509-16
18. **Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, et al.** 1980 A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51:1058-63
19. **Larrea F, Mendez I, Carno C, et al.** 1993 [Current concepts on prolactin physiology: molecular variants and mechanisms of action]. *Rev Invest Clin* 45:375-86
20. **Talwalker PK, Ratner A, Meites J** 1963 In Vitro Inhibition of Pituitary Prolactin Synthesis and Release by Hypothalamic Extract. *Am J Physiol* 205:213-8
21. **Barton AC, Lahti RA, Piercey MF, et al.** 1989 Autoradiographic identification of prolactin binding sites in rat median eminence. *Neuroendocrinology* 49:649-53
22. **Gregerson KA, Selmanoff M** 1988 Selective effects of hyperprolactinemia on in vitro dopamine release from median eminence synaptosomes. *J Neurosci* 8:2477-84
23. **Luciano AA, Chapler FK, Sherman BM** 1984 Hyperprolactinemia in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 41:719-25
24. **Ferrari C, Rampini P, Benco R, et al.** 1982 Functional characterization of hypothalamic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 55:897-901
25. **Hernandez I, Parra A, Mendez I, et al.** 2000 Hypothalamic dopaminergic tone and prolactin bioactivity in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Med Res* 31:216-22
26. **Parra A, Ramirez-Peredo J, Larrea F, et al.** 2001 Decreased dopaminergic tone and increased basal bioactive prolactin in men with human immunodeficiency virus infection. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:731-8
27. **Quigley ME, Judd SJ, Gilliland GB, et al.** 1979 Effects of a dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin in normal women and women with hyperprolactinemic anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 48:718-20
28. **Sowers JR, McCallum RW, Hershman JM, et al.** 1976 Comparison of metoclopramide with other dynamic tests of prolactin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 43:679-81
29. **Maurer RA** 1981 Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294:94-7
30. **Missale C, Nash SR, Robinson SW, et al.** 1998 Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225
31. **Cooper J, Bloom FE, Roth RH** 1996 Dopamine. In: Cooper J BF, Roth RH, (ed) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 7a ed ed. Oxford University Press, New York, pp 293-351
32. **Lew AM, Elsholtz HP** 1995 A dopamine-responsive domain in the N-terminal sequence of Pit-1. Transcriptional inhibition in endocrine cell types. *J Biol Chem* 270:7156-60
33. **Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, et al.** 1994 Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8:356-73
34. **Van De Weerd C, Peers B, Belayew A, et al.** 2000 Far upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology* 71:124-37

35. **Telgmann R, Gellersen B** 1998 Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update* 4:472-9
36. **Reem GH, Ray DW, Davis JR** 1999 The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP. *J Mol Endocrinol* 22:285-92
37. **Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, et al.** 1994 Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12912-6
38. **Levite M, Chowers Y, Ganor Y, et al.** 2001 Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function. *Eur J Immunol* 31:3504-12
39. **Santambrogio L, Lipartiti M, Bruni A, et al.** 1993 Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. *J Neuroimmunol* 45:113-9
40. **Colombo C, Cosentino M, Marino F, et al.** 2003 Dopaminergic modulation of apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells: possible relevance for Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1010:679-82
41. **Cosentino M, Rasini E, Colombo C, et al.** 2004 Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radic Biol Med* 36:1233-40
42. **Tsao CW, Lin YS, Cheng JT** 1997 Effect of dopamine on immune cell proliferation in mice. *Life Sci* 61:PL 361-71
43. **Ghosh MC, Mondal AC, Basu S, et al.** 2003 Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells. *Int Immunopharmacol* 3:1019-26
44. **Ferrari M, Cosentino M, Marino F, et al.** 2004 Dopaminergic D1-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and catecholamine production in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 67:865-73
45. **Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, et al.** 2001 Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol* 120:58-66
46. **Bazan JF** 1990 Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:6934-8
47. **Kelly PA, Djiane J, Kato M, et al.** 1984 The interaction of prolactin with its receptors in target tissues and its mechanism of action. *Recent Prog Horm Res* 40:379-439
48. **Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, et al.** 1992 Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 131:3019-26
49. **Matera L** 1996 Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci* 59:599-614
50. **Matera L, Cutafia M, Geuna M, et al.** 1997 Prolactin is an autocrine growth factor for the Jurkat human T-leukemic cell line. *J Neuroimmunol* 79:12-21
51. **Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, et al.** 1991 Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 129:983-90
52. **Buckley AR** 2001 Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* 10:684-90

53. **Clevenger CV, Russell DH, Appasamy PM, et al.** 1990 Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6460-4
54. **Matera L, Mori M** 2000 Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci* 917:505-13
55. **Matera L, Cesano A, Bellone G, et al.** 1992 Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 6:409-17
56. **Rincheval-Arnold A, Belair L, Cencic A, et al.** 2002 Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. *Mol Cell Endocrinol* 194:95-105
57. **Mukherjee P, Mastro AM, Hymer WC** 1990 Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 126:88-94
58. **Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, et al.** 2003 Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144:2102-10
59. **Tessier C, Prigent_Tessier A, Ferguson_Gottschall S, et al.** 2001 PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 142:4086-94
60. **Buckley AR, Buckley DJ** 2000 Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917:522-33
61. **Fernandez ML, Iglesias MM, Biron VA, et al.** 2003 Protective effect of prolactin and placental lactogen on NO-induced Nb2 lymphoma cell apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 416:249-56
62. **Leff MA, Buckley DJ, Krumenacker JS, et al.** 1996 Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 137:5456-62
63. **Krumenacker JS, Buckley DJ, Leff MA, et al.** 1998 Prolactin-regulated apoptosis of Nb2 lymphoma cells: pim-1, bcl-2, and bax expression. *Endocrine* 9:163-70
64. **Kelly PA, Binart N, Freemark M, et al.** 2001 Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochem Soc Trans* 29:48-52
65. **Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP, et al.** 1999 Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol* 163:576-82
66. **La Montagna G, Meli R, Criscuolo T, et al.** 2004 Bioactivity of prolactin in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 22:145-50
67. **Straub RH, Zeuner M, Lock G, et al.** 1997 High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 36:426-32
68. **Lavalle C, Loyo E, Paniagua R, et al.** 1987 Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14:268-72
69. **Pacilio M, Migliaresi S, Meli R, et al.** 2001 Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus--association with disease activity. *J Rheumatol* 28:2216-21
70. **Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, et al.** 2001 Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. *Lupus* 10:554-61

71. **Jara LJ, Gomez-Sanchez C, Silveira LH, et al.** 1992 Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 303:222-6
72. **Jimena P, Aguirre MA, Lopez-Curbelo A, et al.** 1998 Prolactin levels in patients with systemic lupus erythematosus: a case controlled study. *Lupus* 7:383-6
73. **Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, et al.** 2003 Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment. *J Rheumatol* 30:2140-6
74. **Neidhart M** 1996 Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 23:476-81
75. **Daza L, Lavalle C, Duarte C, et al.** 2003 Lack of association between hyperprolactinemia and soluble IL-2 receptor levels in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 12:107-11
76. **Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD, et al.** 1994 Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 21:2064-7
77. **Buskila D, Lorber M, Neumann L, et al.** 1996 No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 23:629-32
78. **Ostendorf B, Fischer R, Santen R, et al.** 1996 Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus? *Scand J Rheumatol* 25:97-102
79. **Gutierrez MA, Molina JF, Jara LJ, et al.** 1995 Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) activity. *Lupus* 4:348-52
80. **Nagy E, Berczi I** 1991 Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 128:2776-84
81. **McMurray RW** 2001 Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:742-7
82. **Stevens A, Ray DW, Worthington J, et al.** 2001 Polymorphisms of the human prolactin gene--implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:676-83
83. **Uribe AG, Vila LM, McGwin G, Jr., et al.** 2004 The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 31:1934-40
84. **Hunter R** 1970 Standardization of the chloramine-T method of protein iodination. *Proc Soc Exp Biol Med* 133:989-92
85. **Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, et al.** 2006 Multiple cAMP-induced signaling cascades regulate prolactin expression in T cells. *Cell Mol Life Sci* 63:92-9
86. **Gerlo S, Verdood P, Gellersen B, et al.** 2004 Mechanism of prostaglandin (PG)E2-induced prolactin expression in human T cells: cooperation of two PGE2 receptor subtypes, E-prostanoid (EP) 3 and EP4, via calcium- and cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated signaling pathways. *J Immunol* 173:5952-62
87. **McCallum RW, Sowers JR, Hershman JM, et al.** 1976 Metoclopramide stimulates prolactin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 42:1148-52
88. **Masala A, Delitala G, Alagna S, et al.** 1978 Effect of dopaminergic blockade on the secretion of growth hormone and prolactin in man. *Metabolism* 27:921-6

89. **De Marinis L, Mancini A, Maira G, et al.** 1984 Postoperative evaluation of dopaminergic tone in prolactinoma patients. II. Plasma thyrotropin response to metoclopramide. *J Clin Endocrinol Metab* 58:405-9
90. **Barbarino A, De Marinis L, Maira G, et al.** 1978 Serum prolactin response to thyrotropin-releasing hormone and metoclopramide in patients with prolactin-secreting tumors before and after transsphenoidal surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 47:1148-51
91. **Takemoto M, Morishita H, Higuchi K, et al.** 1994 Effects of body weight on responses of serum prolactin to metoclopramide and thyrotrophin-releasing hormone in secondary amenorrhoeic women. *Hum Reprod* 9:800-5
92. **Alvarez-Tutor E, Forga LL, Rodriguez-Erdozain R, et al.** 1999 Persistent increase of PRL after oral contraceptive treatment, Alterations in dopaminergic regulation as possible etiology. *Arch Gynecol Obstet* 263:45-50
93. **Gudelsky GA, Nansel DD, Porter JC** 1981 Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 108:440-4
94. **Ferreira C, Paes M, Gouveia A, et al.** 1998 Plasma homovanillic acid and prolactin in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7:392-7
95. **Candito M, Durant J, Gurle V, et al.** 1995 Cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in AIDS dementia complex. *Aids* 9:1100-1
96. **Bucala R, Lahita RG, Fishman J, et al.** 1985 Increased levels of 16 alpha-hydroxyestrone-modified proteins in pregnancy and in systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 60:841-7
97. **Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW** 1989 Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J* 3:2194-202
98. **McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, et al.** 2002 Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 132:34-40
99. **Ram S, Blumberg D, Newton P, et al.** 2004 Raised serum prolactin in rheumatoid arthritis: genuine or laboratory artefact? *Rheumatology (Oxford)* 43:1272-4
100. **Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, et al.** 1989 Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 125:575-7
101. **Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, et al.** 1989 Regulation of prolactin secretion in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3 by dexamethasone but not other regulators of pituitary prolactin secretion. *Endocrinology* 125:2853-61
102. **Golander A, Barrett J, Hurley T, et al.** 1979 Failure of bromocriptine, dopamine, and thyrotropin-releasing hormone to affect prolactin secretion by human decidual tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49:787-9
103. **Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, et al.** 1999 Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:677-81
104. **Hubina E, Nagy GM, Toth BE, et al.** 2002 Dexamethasone and adrenocorticotropin suppress prolactin secretion in humans. *Endocrine* 18:215-9
105. **Walker SE** 2001 Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:762-8

106. **Boukhris W, Kouassi E, Revillard JP** 1988 Differential effect of mixed D1/D2 and selective D2 dopaminergic antagonists on mouse T and B lymphocyte proliferation and interleukin production in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 10:501-12
107. **Ricci A, Amenta F** 1994 Dopamine D5 receptors in human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding study. *J Neuroimmunol* 53:1-7
108. **Gerlo S, Vanden Berghe W, Verdood P, et al.** 2003 Regulation of prolactin expression in leukemic cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 135:107-16
109. **Telgmann R, Maronde E, Tasken K, et al.** 1997 Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 138:929-37
110. **Peeva E, Venkatesh J, Michael D, et al.** 2004 Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. *Biomed Pharmacother* 58:310-9
111. **Crispin JC, Alcocer-Varela J** 1998 Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus--fifteen years later. *Lupus* 7:214-22
112. **Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, et al.** 1990 Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8:421-52
113. **Juang YT, Wang Y, Solomou EE, et al.** 2005 Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* 115:996-1005
114. **Solomou EE, Juang YT, Gourley MF, et al.** 2001 Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166:4216-22