PROLACTINA COMO MARCADOR BIOQUÍMICO Y GENÉTICO DE SUSCEPTIBILIDAD PARA LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO: ASOCIACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-RNP Y ACTIVIDAD RENAL

Pseudónimo: The scientist

RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona secretada por células de la pituitaria y en sitios extra-pituitarios, tales como células del sistema inmune, en donde participa como un potente inmunomodulador. En sitios extra-pituitarios su expresión es regulada por un promotor alterno, en el que se localiza el polimorfismo -1149 G>T que previamente ha sido asociado con enfermedades autoinmunes en población Europea. En este trabajo, se evaluó al polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* como marcador de susceptibilidad para lupus eritematosos generalizado (LEG) en población del Occidente de México. Asimismo, se analizó la relación de los niveles solubles de PRL con parámetros clínicos e índices de actividad y cronicidad. Las muestras fueron genotipificadas mediante el método PCR-RFLP, mientras que los niveles séricos de PRL y autoanticuerpos fueron medidos por ELISA. La actividad clínica fue evaluada por el índice Mex-SLEDAI y la cronicidad por el índice SLICC. Aplicando un modelo genético recesivo, se asoció a los portadores del genotipo TT con mayor susceptibilidad para LEG (OR 2.26, 95% IC 1.01-5.08; p=0.04); asimismo, con mayor daño (índice SLICC) (p =0.02) y con la presencia de anticuerpos anti-RNP (p=0.04). Por otra parte, se observó una correlación negativa entre PRL sérica y la edad (r = -0.33, p<0.001). Los pacientes con LEG presentaron niveles séricos de PRL más altos que los SC (p<0.001). Además, los niveles altos de PRL se asociaron con afección renal y anticuerpos anti-RNP. En conclusión, el genotipo TT del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* es un marcador de susceptibilidad para LEG en población del Occidente de México, mientras que PRL sérica elevada se asocia con afección renal y producción de anticuerpos anti-RNP en pacientes con LEG.

Palabras clave: Prolactina (PRL) *Lupus eritematoso generalizado (LEG) *Polimorfismo *Índice SLICC *Anti-RNP

INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune prototipo, que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos e inflamación sistémica crónica que puede afectar a múltiples órganos. El curso y pronóstico de la enfermedad es muy variable, con periodos de activación y remisión (1,2).

A nivel mundial, la incidencia de LEG se estima aproximadamente en 1 a 10 por cada 100,000 personas al año y la prevalencia de 20 a 70 por cada 100,000 personas; pero estas cifras pueden variar entre las distintas poblaciones (3).

En México, el estudio realizado por el Programa Comunitario Orientado para el Control de Enfermedades Reumáticas (COPCORD), reportó una prevalencia general del 0.07% para esta enfermedad (4).

Aunque la etiopatogenia del LEG es desconocida, se han asociado factores genéticos, epigenéticos, ambientales, hormonales e inmunoreguladores con el inicio y el desarrollo de esta patología (5). Los factores hormonales parecen tener un papel clave en la predisposición a LEG, debido a la mayor incidencia de LEG en el género femenino, con una razón de 9 mujeres por cada hombre, lo que sugiere que factores endocrinos modulan el riesgo y el desarrollo de la enfermedad (6,7). Además, se ha demostrado en modelos murinos que la administración de estrógeno o prolactina (PRL) puede conducir a un fenotipo autoinmune con un aumento de células B autorreactivas y que la PRL acelera el desarrollo de la enfermedad en ratones susceptibles a lupus (8).

La PRL es una hormona con un papel importante en múltiples funciones biológicas, tales como la reproducción, el embarazo, el crecimiento, el metabolismo y la modulación del sistema inmune (9). Es producida por los lactotropos de la glándula pituitaria y por muchas otras células extrapituitarias, como las células del sistema inmune (10,11). La PRL actúa como una citocina y puede promover la maduración de los timocitos $CD4^-$ $CD8^-$ a células T $CD4^+$ $CD8^+$ a través de su capacidad para inducir la expresión del receptor IL-2 (12). Notablemente, esto sustenta que los

niveles de PRL en suero se correlacionen con el número de linfocitos B y T $CD4^+$ (13). Por otra parte, la PRL antagoniza la apoptosis de timocitos en condiciones de aumento de glucocorticoides (GCs), tales como en condiciones de estrés, manteniendo así la supervivencia y función de los linfocitos T (14), lo cual es preponderante en las enfermedades autoinmunes como el LEG.

En enfermedades autoinmunes, se ha demostrado la presencia de hiperprolactinemia (HPRL) (15); aproximadamente el 25-30% de los pacientes con LEG tienen un leve o moderado aumento de los niveles de prolactina sérica (16,17) y estos niveles elevados de PRL parecen correlacionarse con la actividad clínica de la enfermedad y la presencia de autoanticuerpos (10,18–20), mientras que esta correlación es refutada por otros estudios (21–23). Estas discrepancias pueden estar influenciadas por factores genéticos (24).

La transcripción del gen *PRL* está regulada por dos principales regiones promotoras (25). La región promotora proximal dirige la expresión específica en la pituitaria, mientras que una región alterna, que engloba un exón no codificante y que es conocida como "promotor superdistal", dirige la síntesis de la PRL en sitios extrapituitarios (26,27). Este promotor, contiene un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la posición -1149 G>T (rs1341239), el cual se ha demostrado que afecta la transcripción del gen de la prolactina en linfocitos (28). Estudios previos asocian este SNP con susceptibilidad a LEG en algunas poblaciones (28–30), pero estos hallazgos no son consistentes (31).

El objetivo del presente estudio de casos y controles fue evaluar a la prolactina como marcador biológico y genético de LEG en población del Occidente de México, a través del análisis del polimorfismo funcional -1149 G>T en el gen *PRL* y de los niveles séricos de PRL.

MATERIALES Y METODOS

Población de estudio

La población de estudio consistió en 163 pacientes con LEG clasificados de acuerdo a los criterios de 1997 del Colegio Americano de Reumatología (ACR), reclutados del servicio de Reumatología del Hospital General de Occidente de Zapopan, Jalisco., México. Se aplicó a los pacientes la versión Mexicana del índice de actividad de lupus (MEX-SLEDAI) (32) y el índice validado de medición del daño acumulado en pacientes con LEG (SLICC) (33). Además se incluyeron como sujetos control (SC) 326 individuos sanos.

En ambos grupos se consideró indispensable una ancestría de por lo menos tres generaciones originarias del Occidente de México.

Consideraciones éticas

Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes con LEG y SC antes de la inclusión en el estudio, de acuerdo a las guías éticas de la Declaración de Helsinki del 2013.

Evaluación clínica

Para la valoración clínica, se obtuvo una muestra de sangre periférica de los pacientes con LEG y SC y se realizaron las siguientes determinaciones: velocidad de sedimentación globular (VSG) mediante el método de Wintrobe, citometría hemática completa y cuantificación de los niveles de autoanticuerpos (anticuerpos anti-DNA de doble cadena, anti-Ro, anti-La, anti-Sm y anti-RNP) por el método de ELISA (Binazyme, The Binding Site Ltd.; Birmingham, UK).

Determinación de los niveles solubles de PRL

Para descartar posibles sesgos por género, la concentración sérica de PRL se determinó en un subgrupo de 117 mujeres con LEG y 117 mujeres SC pareadas por edad. Además, se excluyeron mujeres embarazadas y bajo algún tratamiento o enfermedad conocida que afectaran las concentraciones séricas de PRL. El ensayo

se realizó mediante el ensayo comercial de ELISA EIA-1291; DRG, International, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0.35 ng/mL. La hiperprolactinemia se definió como niveles séricos de PRL mayores a 20 ng/mL.

Análisis molecular

A partir de las muestras de sangre periférica de los pacientes con LEG y SC se realizó la extracción de DNA mediante la técnica modificada de Miller (34).

Genotipificación del polimorfismo -1149 G>T en el gen PRL

La genotipificación del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP, utilizando los iniciadores reportados por Donn y cols. (35); sentido: 5′-AGA ATT GGA GTT CCA GTG CC-3′, antisentido: 5′-ATC ACA CTC AAC CAG TTG GC-3′. La PCR se realizó a un volumen final de 25 µL, conteniendo 100 ng de gDNA, 0.04 µM de cada iniciador, 0.6 U de *Taq* polimerasa, 1X de buffer de enzima, 4 mM de $MgCl_2$ y 0.1 mM de dNTPs (Invitrogen™ life technologies). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos que incluyen la desnaturalización a 95 °C, alineamiento a 58 °C, extensión a 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 5 min. EL fragmento de 366 pb obtenido fue sometido a digestión con 3 U de la enzima *ApoI* (NewEngland, BioLabs, Inc.) a 50 °C por 1 h y los fragmentos de restricción fueron visualizados después de la electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con $AgNO_3$ al 2%. El alelo G generó un sitio de restricción para *ApoI* obteniendo 2 fragmentos de 280 y 58 pb, mientras que el aleo T fue identificado por un solo fragmento de 338 pb.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los paquetes estadísticos STATA versión 9.2 y GraphPad Prism versión 5.0. Para el análisis descriptivo, las variables nominales fueron expresadas como frecuencias; las variables continuas con distribución no paramétrica se reportaron como medianas, rangos intercuartiles 25-75 y percentiles 5-95; mientras que las variables con distribución normal se expresaron como medias ± DE. Las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron

por conteo directo. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg con la prueba de χ^2. La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas se realizó mediante la prueba χ^2 de Pearson y también se evaluó el polimorfismo mediante los modelos genéticos dominante y recesivo (36); el odds ratio (OR) e intervalos de confianza del 95% (IC 95%) se utilizaron para analizar el riesgo de LEG asociado al polimorfismo -1149 G>T.

Las diferencias en los parámetros clínicos entre pacientes con LEG y SC o entre los portadores del genotipo GG, GT y TT fueron evaluados por la prueba t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis, según correspondía. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG

Se incluyeron 489 sujetos originarios del Occidente de México. Los cuales se clasificaron en dos grupos: 326 sujetos control y 163 sujetos con LEG clasificados de acuerdo a los criterios de clasificación establecidos por el ACR en 1997.

Las características clínicas y demográficas de los 163 pacientes con LEG incluidos en este estudio se muestran en el cuadro 1, en donde se observa que la media de edad fue de 36 años (18 a 65 años) y que había una mayor proporción de mujeres (96%) que hombres (4%). En promedio, los pacientes tenían un tiempo de diagnóstico de la enfermedad de 6 años (0-25 años) y la mediana de individuos presentó una actividad leve de la enfermedad, medida con el índice de actividad Mex-SLEDAI (puntaje MEX-SLEDAI: 2).

Respecto a los tratamientos, se muestra que la mayoría de los pacientes fueron tratados con prednisona (52%), azatioprina (43%) y cloroquina (32%).

Cuadro 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG

Variables	n = 163
Características demográficas	
Edad, años [a]	36 (18-65)
Género % (n) [b]	
Femenino	96 (156)
Masculino	4 (7)
Tiempo de evolución, años [a]	6 (0-25)
Evaluación clínica	
Mex-SLEDAI [a]	2 (0-9)
SLICC[a]	0 (0-2)
VSG, mm/hora [c]	32 ± 14
Afección renal % (n) [b]	9 (14)
IRC % (n) [b]	5 (8)
PRL (ng/mL) [a]	7.5 (2.8-18.8)
Autoanticuerpos % (n) [b]	
ANAs	120 (74)
Anti-dsDNA	44 (72)
Anti-La	4 (7)
Anti-Ro	10 (16)
Anti-Sm	7 (11)
Anti-RNP	11 (18)
Tratamiento % (n) [b]	
AINEs	4 (7)
Corticoesteroides	
Prednisona	52 (85)
DMARDs	
Metotrexato	12 (19)
Azatioprina	44 (71)
Cloroquina	32 (52)
Hidroxicloroquina	9 (15)
Ciclofosfamida	7 (11)

[a]Datos proporcionados en mediana (p5-p95). [b]Datos proporcionados en porcentajes y n. [c]Datos proporcionados en medias ± DE. ANAS, anticuerpos antinucleares; VSG, velocidad de sedimentación globular; IRC, insuficiencia renal crónica; PRL, prolactina; AINEs, anti-inflamatorios no esteroideos; DMARDs, fármacos anti-reumáticas modificadores de la enfermedad.

Identificación del SNP -1149 G>T en el gen PRL

La identificación del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* se realizó después de someter a digestión los productos amplificados por PCR (338 pb), con la enzima *ApoI,* la cual corta el fragmento en presencia del alelo silvestre (alelo G). Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y se tiñeron con nitrato de plata al 0.2%. La identificación de los genotipos se observa en la Figura 1.

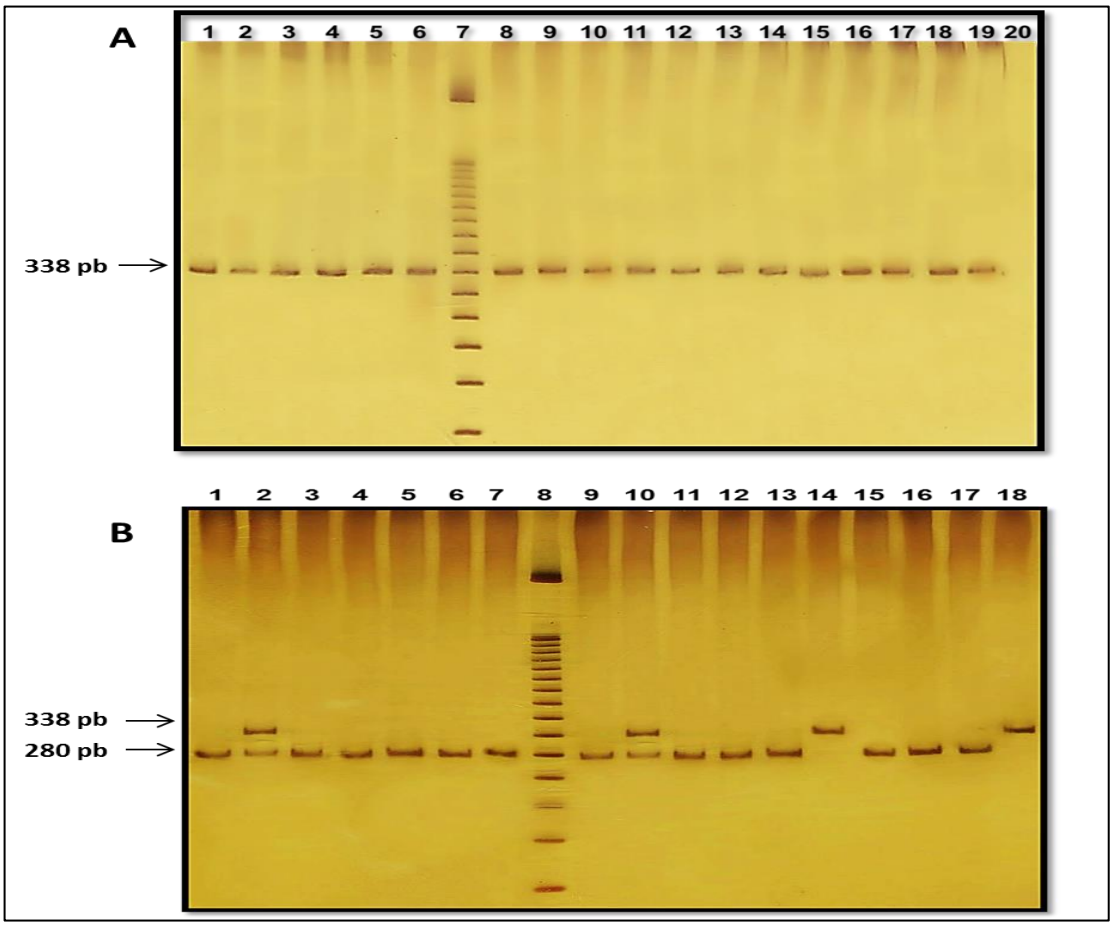

Figura 1. Geles de poliacrilamida que muestran los genotipos del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL*. A) Se muestra el fragmento de 338 pb amplificado por PCR (carril 7, marcador de peso molecular de 50 pb). B) Se muestran los patrones de digestión para los tres genotipos GG (**280 pb y** 58 pb), GT (**338 pb, 280 pb** y 58 pb) y TT (**338 pb**); en el carril 8 se muestra el marcador de peso molecular de 50 pb. En negrita se marcan los fragmentos visibles para cada genotipo.

Distribución del SNP -1149 G>T en el gen PRL

El polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL*, se encontró en equilibrio génico de Hardy-Weinberg en el grupo control (p=0.08, χ^2=3.36). La distribución del polimorfismo en pacientes con LEG y SC se muestra en el cuadro 2. La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos, mostró diferencias significativas (p=0.02), por lo cual se realizaron modelos genéticos de herencia (recesivo y dominante), observando diferencias significativas (p= 0.04) en las frecuencias genotípicas siguiendo un modelo genético recesivo (36). De acuerdo con este modelo, se observa una asociación entre el genotipo TT con incremento de susceptibilidad a LEG (OR 2.26, 95% CI 1.01–5.08; p = 0.04).

Cuadro 2. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL*

SNP -1149 G>T (rs1341239)	**LEG (n = 163) n (%)[a]**	**SC (n = 326) n (%)[a]**	**Valor *p****	**OR (IC 95%); *p*[§]**
Genotipo				
GG[b]	101 (62)	185 (56)	0.02	1.0
GT	49 (30)	129 (40)		0.69 (0.46-1.04); 0.08
TT	13 (8)	12 (4)		1.98 (0.87-4.51); 0.10
Alelo				
G[b]	251 (77)	499 (76)	0.87	1.0
T	75 (23)	153 (24)		0.97 (0.70-1.35); 0.87
Do				
GG[b]	101 (62)	185 (57)	0.27	1.0
GT+TT	62 (38)	141 (43)		0.80 (0.54-1.18); 0.27
Re				
GG+GT[b]	150 (92)	314 (96)	**0.04**	1.0
TT	13 (8)	12 (4)		**2.26 (1.01-5.08); 0.04**

Los porcentajes fueron obtenidos por conteo directo. [a]Datos proporcionados en n y porcentajes. [b]Categoría de referencia. LEG, lupus eritematoso generalizado; SC, sujetos control; Do, modelo genético dominante; Re, modelo genético recesivo. *Valor de p calculado por χ^2. [§]Valor de p calculado por regresión logística.

Asociación del polimorfismo -1149 G>T con parámetros clínicos en LEG

Se compararon las frecuencias genotípicas con los parámetros clínicos e índices de actividad clínica en LEG, de acuerdo al modelo genético recesivo (Cuadro 3). Al realizar esta comparación, se encontró que los portadores del genotipo TT tenían mayor daño corporal medido con el índice SLICC en comparación con los portadores del alelo G (grupo GG + GT) (p= 0.02). Asimismo, se observó que en el grupo de portadores del genotipo TT, había mayor porcentaje de individuos con anti-RNP positivo, a diferencia de los portadores del alelo G (p = 0.04).

Cuadro 3. Parámetros clínicos, actividad clínica e índices de actividad y cronicidad en LEG de acuerdo con el modelo genético recesivo para el polimorfismos −1149 G>T en el gen *PRL*.

Variable	GG+GT (n = 150)	TT (*n* = 13)	Valor P
Evaluación clínica			
Mex-SLEDAI[c]	2 (0-8)	1 (0-11)	0.68
SLICC[c]	0 (0-2)	1 (0-3)	**0.02**
VSG (mm/hora)[b]	31.87±14.06	36.78±12.47	0.32
Afección renal n (%)[a]	13 (8.67)	1 (7.69)	0.67
IRC n (%)[a]	7 (4.67)	1 (7.70)	0.50
PRL (ng/mL)[c]	7.33 (2.87-17.26)	10.12 (2.39-17.20)	0.38
Autoanticuerpos n (%)[a]			
ANAs	111 (74)	9 (69)	0.65
Anti-dsDNA	64 (43)	8 (62)	0.29
Anti-La	7 (5)	0 (0)	0.71
Anti-Ro	16 (11)	0 (0)	0.44
Anti-Sm	10 (7)	1 (8)	0.47
Anti-RNP	15 (10)	3 (23)	**0.04**

[a]Datos proporcionados en n y porcentajes; Pueba exacta de Fisher. [b]Datos proporcionados en medias ± DE; Prueba t de student. [c]Datos proporcionados en medianas (p5-95); Prueba U de Mann-Whitney. VSG, velocidad de sedimentación globular; IRC, insuficiencia renal crónica; PRL, prolactina.

Comparación de los niveles séricos de PRL en LEG y SC

Un incremento significativo en los niveles de PRL fue encontrado en los pacientes con LEG comparado con los SC (7.5 vs. 5.3 ng/mL; $p < 0.001$; Figura 2). Además, se encontró hiperprolactinemia (valores >20 ng/mL) en 5.9% de los pacientes con LEG.

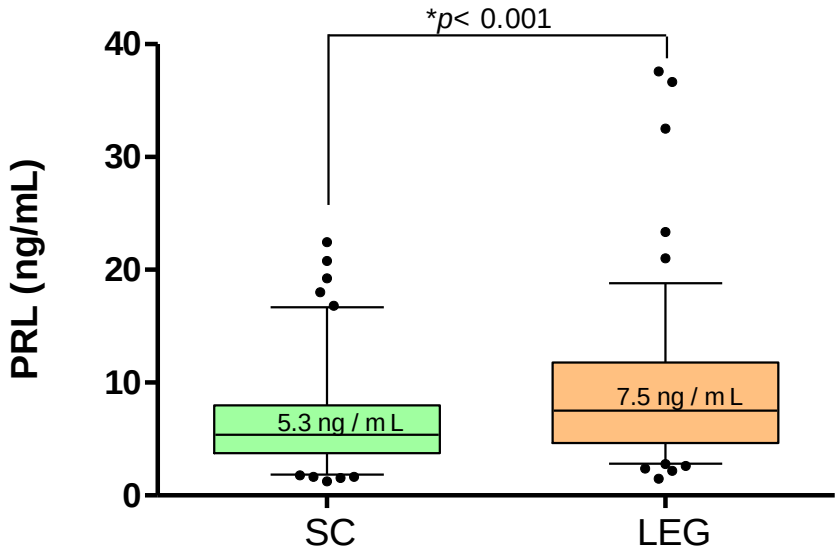

Figura 2. Niveles solubles de PRL en pacientes con LEG y SC. Datos proporcionados en medianas y percentiles 5-95. Los círculos negros indican los valores que sobrepasaron los percentiles 5-95.*Prueba de Mann–Whitney. LEG: lupus eritematoso generalizado; SC: sujetos control.

Asociación del polimorfismo -1149 G>T con los niveles solubles de PRL

Se analizó el impacto del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* sobre los niveles séricos de PRL, por lo que se estratificaron los niveles de PRL de acuerdo al SNP -1149 G>T bajo el modelo de herencia genético recesivo.

Se observaron diferencias significativas al comparar los niveles solubles de PRL de portadores del alelo G (GG + GT) entre pacientes con LEG y SC; los SC tenían una mediana de 5.3 ng/mL de PRL, mientras los pacientes con LEG de 10.7 ng/mL (p=0.002). Una tendencia similar se observó entre los portadores del genotipo TT, sin embargo estas diferencias no fueron significativas (p=0.2) (Figura 3).

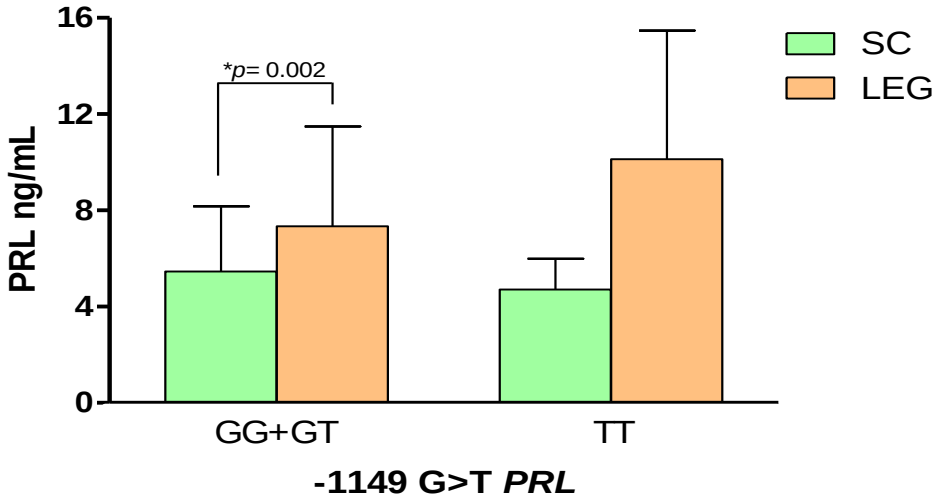

Figura 3. Concentraciones de PRL por genotipo en LEG y SC de acuerdo al modelo genético recesivo. Datos proporcionados en mediana (p25-p75). Prueba U de Mann-Whitney. (TT SC vs TT LEG, p =0.2)

Relación de los niveles solubles de PRL con características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG

Se evaluó la relación entre los niveles solubles de PRL y los parámetros clínicos de los pacientes con LEG y se encontró una correlación negativa entre los niveles solubles de PRL y la edad (r= -0.33, *p*<0.001) (Figura 4).

Una correlación similar fue observada entre PRL y el tiempo de diagnóstico de la enfermedad (r= -0.02, *p*= 0.02) (Figura 5), la cual fue corroborada al comparar los niveles de PRL entre pacientes con un tiempo de diagnóstico de LEG ≤ 1 año (edad promedio 39 años; MEX-SLEDAI 2.6) y pacientes con >1 de un año de diagnóstico (edad promedio 40 años; MEX-SLEDAI 2.3), ya que se observaron mayores niveles de PRL en los pacientes con menor tiempo de diagnóstico de la enfermedad (*p*= 0.02) (Figura 6).

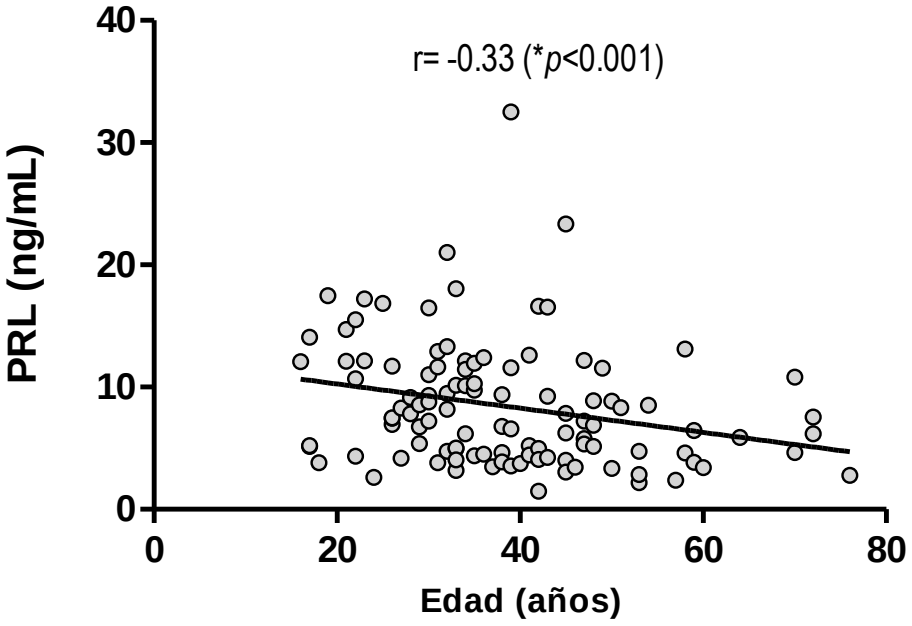

Figura 4. Correlación de los niveles solubles de PRL por edad. Se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y la edad. Prueba de correlación de Spearman.

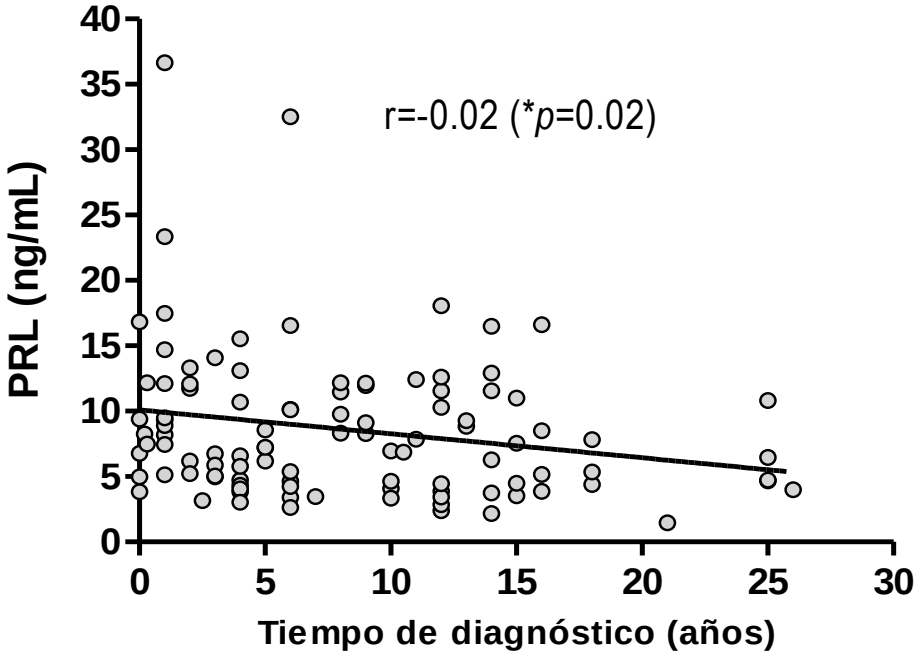

Figura 5. Correlación de los niveles solubles de PRL por tiempo de diagnóstico. Se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y el tiempo de diagnóstico. Prueba de correlación de Spearman.

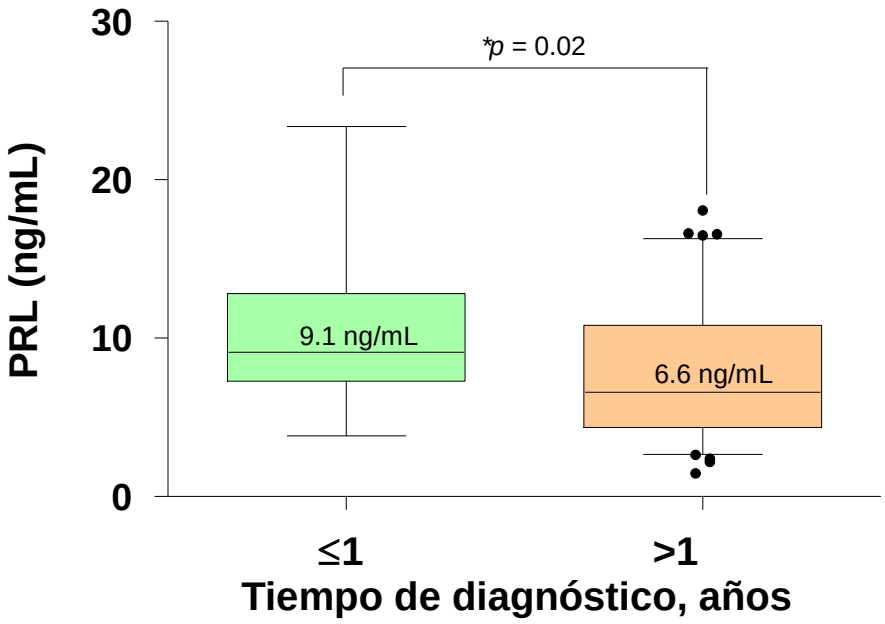

Figura 6. Comparación de los niveles solubles de PRL categorizados por tiempo de diagnóstico. Datos proporcionados en mediana (p5–p95). Prueba U de Mann–Whitney.

También se evaluó la relación de los niveles solubles de PRL con la actividad de la enfermedad, por lo cual, se estratificó a los pacientes de acuerdo a los puntajes del índice de actividad Mex-SLEDAI: remisión (puntaje Mex-SLEDAI <2; actividad leve a moderada (puntaje Mex-SLEDAI ≥2 a <8) y actividad severa (puntaje Mex-SLEDAI ≥ 8).

De acuerdo a esta estratificación se observó un ligero incremento de los niveles solubles de PRL en pacientes con actividad severa (11.0 ng/mL) en comparación con los niveles de pacientes en remisión (7.8 pg/mL) y con actividad leve a moderada de la enfermedad (6.8 ng/mL); sin embargo estas diferencias no fueron significativas (*p*= 0.2) (Figura 7).

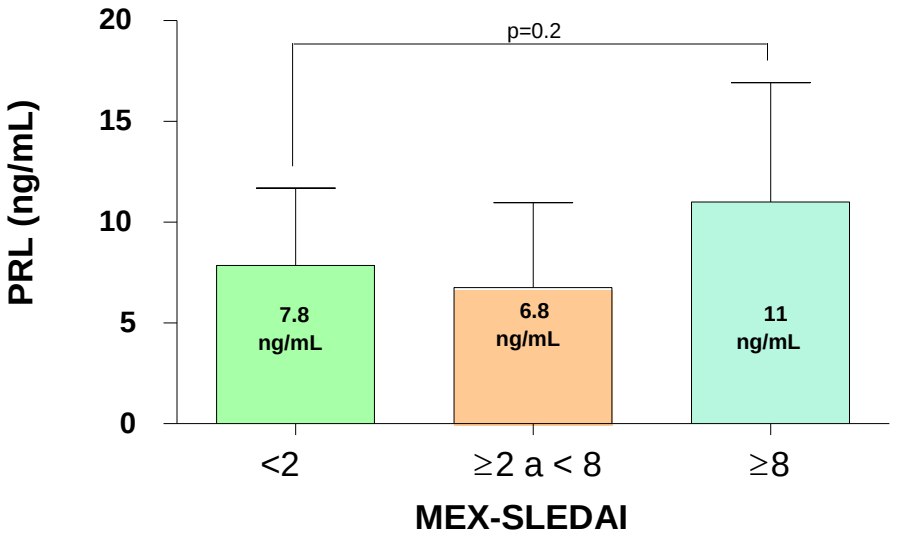

Figura 7. Niveles solubles de PRL en pacientes con LEG de acuerdo al puntaje del índice Mex-SLEDAI. Datos proporcionados en medianas (p25-p75). Prueba de Kruskal-Wallis.

Además, se evaluó la relación de los niveles solubles de PRL con todos los anticuerpos antinucleares determinados (anti-Ro, anti-La, anti-Sm, Anti-RNP), por lo cual se estratificó a los pacientes en dos grupos: seropositivos o seronegativos para cada anticuerpo.

Al realizar la comparación entre los grupos antes descritos, se observó una tendencia de mayores niveles de PRL en los pacientes seropositivos para cada anticuerpo en comparación con los pacientes seronegativos (Figura 8); sin embargo, solo se observaron diferencias significativas al comparar los niveles solubles de PRL estratificados con base en la seropositivad a anticuerpos anti-RNP (p=0.004) (Figura 9).

Finalmente, se estratificaron los niveles de PRL con base en pacientes con o sin afección renal y se observó que los pacientes con afección renal presentaban mayores niveles de PRL (p=0.004) (Figura 10).

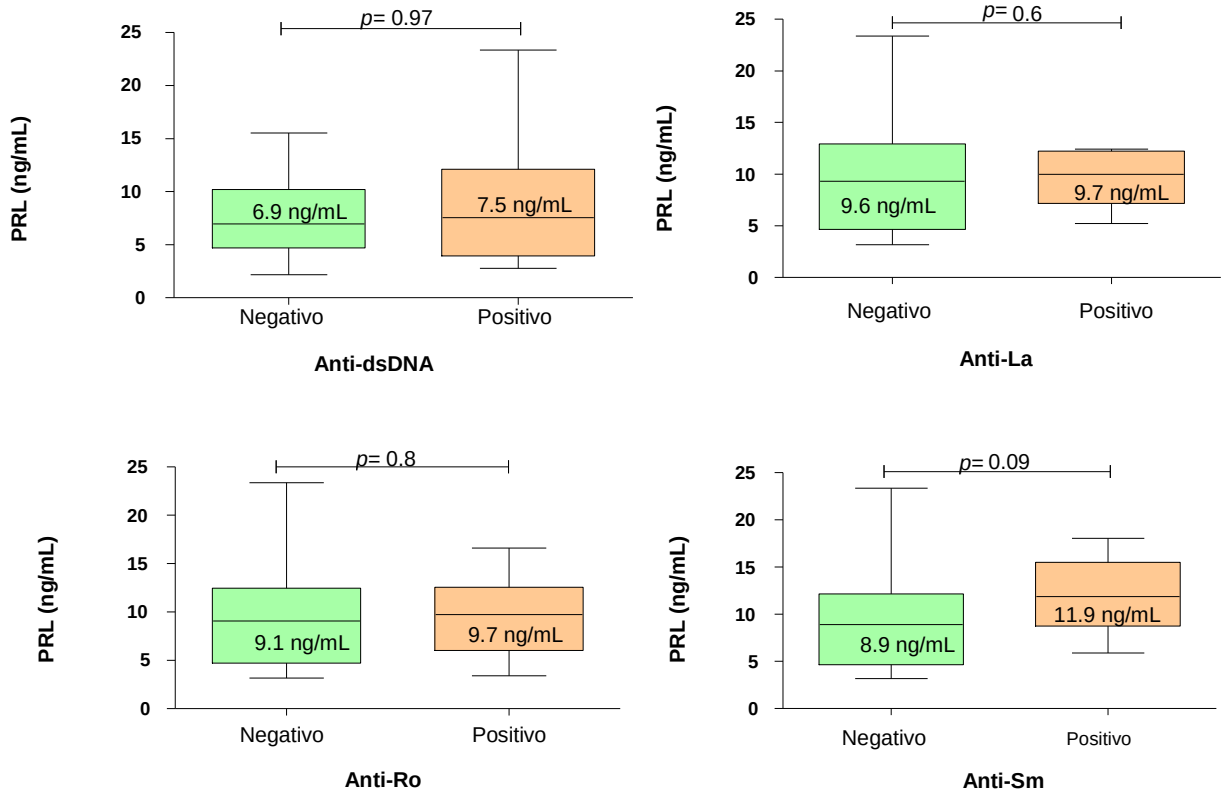

Figura 8. Niveles solubles de PRL categorizados con base en pacientes seropositivos o negativos para autoanticuerpos. Datos proporcionados en mediana (p5–p95). Prueba U de Mann–Whitney.

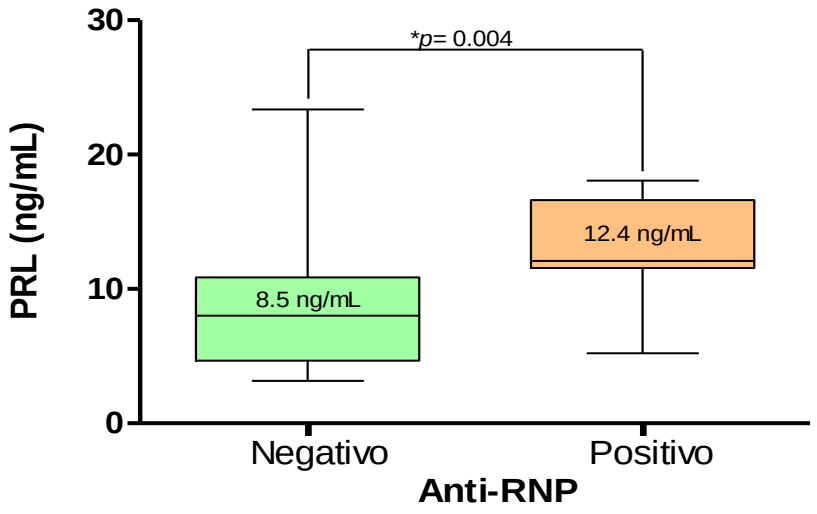

Figura 9. Niveles solubles de PRL categorizados con base en pacientes seropositivos o negativos para anticuerpos anti-RNP. Datos proporcionados en mediana (p5–p95). Prueba U de Mann–Whitney.

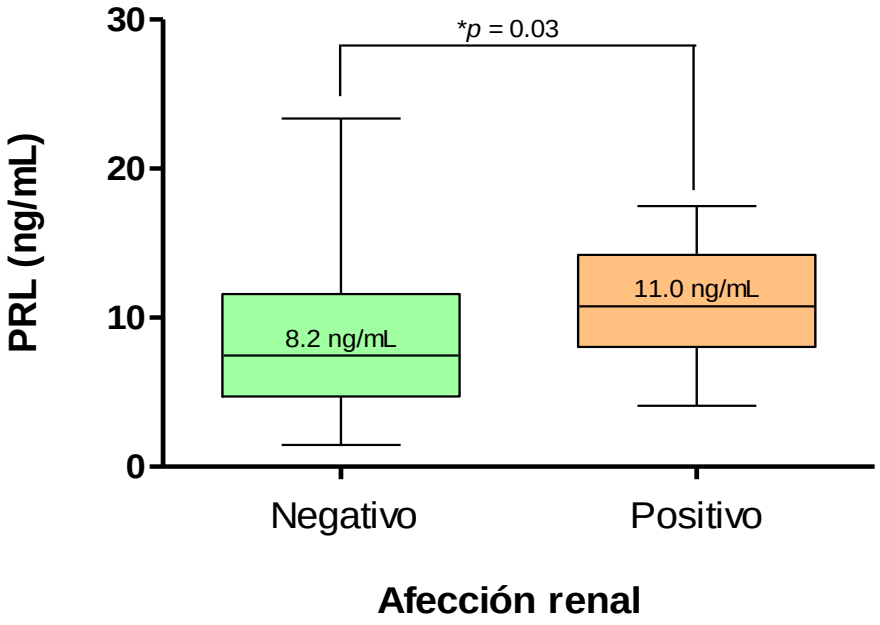

Figura 10. Niveles solubles de PRL categorizados con base en pacientes con o sin afección renal. Datos proporcionados en mediana (p5–p95). Prueba U de Mann–Whitney.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó la asociación del SNP funcional -1149 G>T en el gen *PRL* y de los niveles solubles de PRL con LEG en población mestiza del Occidente de México.

El polimorfismo -1149 G>T ha sido estudiado en varias enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple (31), artritis psoriásica (37), esclerosis sistémica (38), LEG (29,30) y AR (39). Sin embargo, este es el primer estudio que evalúa la asociación entre este polimorfismo con LEG en población del Occidente de México.

De acuerdo a las frecuencias genotípicas y alélicas, el SNP -1149 G>T mostró una distribución similar a la reportada previamente por nuestro grupo de estudio en población del Occidente de México con AR y SC (39). Además, se encontraron diferencias significativas (p= 0.02) en las frecuencias genotípicas de este polimorfismo entre pacientes y controles, observándose mayor frecuencia del genotipo TT en pacientes con LEG en comparación de los SC.

Posteriormente, se aplicó un modelo genético recesivo para el SNP -1149 G>T, el cual indica que se necesitan 2 alelos polimórficos (T) para poder modificar el riesgo de la enfermedad. De acuerdo a este modelo genético, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con LEG y SC (*p*= 0.04), con una OR de 2.26 (IC 1.01-5.08; *p*= 0.04) para los portadores del genotipo TT. Estos resultados son diferentes a estudios previos reportados en LEG en población Checa (30) y en población del Centro de México (29), los cuales no encontraron diferencias significativas entre grupos de estudio para el SNP -1149 G>T, sin embargo, encontraron asociación del alelo G con actividad clínica en los pacientes con LEG, a diferencia de nuestros resultados, ya que observamos mayor frecuencia del genotipo TT en pacientes con LEG, lo que sugiere que este genotipo es un marcador de riesgo para nuestra población.

Estas diferencias entre la distribución de las frecuencias genotípicas del SNP -1149 G>T entre nuestra población de estudio y las citadas previamente, se pueden atribuir a los criterios de inclusión, al tamaño de muestra de cada estudio y principalmente a la influencia racial, ya que pueden existir subgrupos genéticos incluso entre mestizos Mexicanos, debido a que estudios genéticos han estimado que los mestizos del Occidente de México tienen un mayor componente genético de origen Europeo occidental (≈60%), seguido de Amerindio (≈25%) y Africano (≈15%), mientras que los mestizos del Centro de México tienen menor ascendencia Europea (40). Sin embargo, estos resultados también fueron diferentes a los encontrados previamente en nuestro equipo de trabajo en pacientes con AR (39), ya que reportaron que el alelo T se asocia con un efecto protector para AR (OR 0.64, IC 95% (0.45-0.92); p=0.011), lo que se justifica debido a que se observó que el alelo T se asocia con menores niveles de expresión del mRNA del gen *PRL,* similar a lo previamente reportado por Stevens y cols.,2001, por lo que nuestros resultados deben ser interpretados con precaución debido a que el valor de p observado es muy cercano a 0.05 y el intervalo de confianza inferior es cercano a la unidad, lo que le da un bajo poder estadístico a la asociación observada en el presente estudio y podría indicar que las diferencias entre las distribuciones genotípicas observadas pueden ser una asociación estadística más que funcional.

Por otra parte, se compararon las frecuencias genotípicas del SNP -1149 G>T de acuerdo al modelo genético recesivo con las características clínicas de los pacientes con LEG y se observó que en los portadores del genotipo TT existían individuos con mayor índice de daño según el índice SLICC y había mayor frecuencia de pacientes seropositivos a anticuerpos anti-RNP, lo que sugiere que este genotipo, además de conferir susceptibilidad a la enfermedad, también puede contribuir en la fisiopatología de las características autoinmunes presentes en LEG.

Estos hallazgos también fueron diferentes a los encontrados previamente en nuestro equipo de trabajo (39) en pacientes con AR, ya que se observaron títulos de anti-CCP más elevados entre los portadores del genotipo GG, comparados con los portadores del alelo T. Estas diferencias entre el genotipo y la producción de auto-anticuerpos pueden ser debidas al ambiente diferencial de cada enfermedad, puesto que existen además de PRL, otras citocinas que pueden estar contribuyendo en la generación de auto-anticuerpos. Una de estas citocinas puede ser IL-10, ya que se ha demostrado que induce fuertemente la activación de células B y la producción de autoanticuerpos de manera dosis-dependiente; la producción de esta citocina es mayor en PBMCs de pacientes con LEG en comparación con pacientes con AR (41), por lo que en LEG, la IL-10 podría estar enmascarando el efecto atribuido al polimorfismo -1149 G>T del gen *PRL*.

Por otra parte, es posible que *in vivo,* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con LEG, exista una producción similar o mayor de otros factores de transcripción (además de GATA-3), que pueden estar reconociendo la secuencia creada por el alelo T del SNP -1149 G>T e induciendo la transcripción del gen *PRL,* contrario al efecto *in vitro* sugerido para el factor de transcripción GATA3. Por lo que el alelo T puede estar asociado con niveles séricos incrementados de PRL, lo cual justificaría las asociaciones del SNP con parámetros clínicos observadas en este estudio.

Una vez relacionadas las frecuencias del SNP -1149 G>T con los parámetros clínicos, se compararon los niveles solubles de PRL en LEG y SC, encontrando concentraciones séricas más elevadas en los pacientes con LEG (7.5 ng/mL) en comparación con los SC (5.3 ng/mL), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0.001$). Estos resultados son similares a los reportados en varios

estudios (17,20,42), lo que apoya que en LEG existe una desregulación en la producción de PRL y que esta citocina puede estar participando como un modulador importante de la respuesta inmune (15).

El mecanismo exacto de cómo se alteran los niveles de PRL en pacientes con LEG no está claro, pero se sugiere una implicación importante de las proteínas de la familia CREB (elemento de respuesta a AMPc, del inglés *cAMP response element-binding*), ya que funcionan como factores de transcripción e incrementan la expresión génica de *PRL* en los linfocitos. Estas proteínas son activadas mediante fosforilación y se ha descrito que las concentraciones de CREB fosforilado son más elevadas en linfocitos de pacientes con LEG en comparación con SC (43).

Por otra parte, se compararon los niveles de PRL por genotipo en pacientes con LEG y SC para determinar la contribución del SNP -1149 G>T sobre los niveles solubles de PRL, así como también para esclarecer la asociación observada entre el genotipo TT con parámetros clínicos en LEG. Al realizar la comparación, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de PRL por genotipo, posiblemente porque este SNP se encuentra en el promotor extra-pituitario del gen *PRL* y sabemos de antemano que la mayoría de la PRL es sintetizada por la hipófisis, bajo el control de un promotor independiente. No obstante, se observó una tendencia de niveles de PRL más altos en lo portadores del genotipo TT en LEG, contrario a los observado en SC. Esta tendencia apoya la asociación del genotipo TT con mayor daño y presencia de anticuerpos anti-RNP observada en este estudio. No obstante, no se descarta que la relación inversa que se observa entre la producción de PRL dependiente de genotipo entre pacientes con LEG y SC pueda estar indicando que independientemente del genotipo, existe un aumento en la síntesis de PRL en pacientes con LEG debido al ambiente inflamatorio que cursan estos pacientes, el cual puede estar potenciando la secreción de esta hormona y conllevando a valores alterados, los cuales se asocian con las manifestaciones y parámetros clínicos en LEG, a diferencia de los SC en la que los niveles séricos de esta hormona no están directamente relacionados con algún proceso patológico.

Adicionalmente, se evaluaron los niveles solubles de PRL con las características demográficas e índices de actividad de la enfermedad, encontrando una correlación negativa entre los niveles solubles de PRL y la edad (r= -0.33, $p<0.001$), indicando que a mayor edad, los niveles de PRL tienden a disminuir; lo cual es similar a lo reportado por Vekemans and Robyn, 1975 (44). Una posible explicación a estos hallazgos es que los estrógenos en las mujeres disminuyen con le edad y debido a que estimulan la producción de PRL, su disminución puede alterar directamente la concentración de PRL dependiendo de la edad.

Una correlación negativa también se observó al comparar la PRL con el tiempo de diagnóstico de la enfermedad (r= -0.02, p= 0.02). Esto fue corroborado cuando se compararon los niveles de PRL estratificando en grupos de pacientes con ≤1 de un año de diagnóstico de LEG y mayores de 1 año de diagnóstico (con edades e índices MEX-SLEDA similares), observando niveles de PRL más altos (9.1 ng/mL) en pacientes con ≤ 1 de un año de diagnóstico de LEG en comparación con los pacientes de más de 1 año de diagnóstico (6.6 ng/mL) (p=0.02).

Estos resultados nos permiten especular que independientemente de la edad y actividad de la enfermedad, la PRL puede verse alterada en etapas tempranas del LEG y puede participar de manera importante en el desarrollo de las manifestaciones de la enfermedad, posiblemente como respuesta a una inflamación aguda inicial en LEG, lo cual es similar a lo reportado en modelos murinos de LEG (45).

Además, se evaluó la relación de los niveles solubles de PRL con la actividad de la enfermedad (índice Mex-SLEDAI), observando un ligero incremento de los niveles solubles de PRL en los pacientes con actividad severa; sin embargo, no se observaron diferencias significativas, tal vez debido a nuestro bajo porcentaje de pacientes con actividad severa (7%). No obstante, existen estudios reportados (46,47), que sustentan una correlación positiva de los niveles solubles de PRL con la actividad de la enfermedad.

Otro hallazgo importante, fue la tendencia de mayores niveles de PRL en pacientes seropositivos a los autoanticuerpos anti-dsDNA, anti-La, anti-Ro y anti-Sm en comparación con pacientes seronegativos. Asimismo la asociación de la presencia de anticuerpos anti-RNP (p= 0.004) con niveles más altos de PRL. Estos resultados sugieren que la PRL puede ser un factor importante en la estimulación de células B y la subsecuente producción de autoanticuerpos, por lo que la PRL puede estar implicada en la pérdida de la tolerancia inmunológica. Esta hipótesis es apoyada por un estudio previo, que reportó una correlación positiva entre niveles solubles de PRL con anticuerpos anti-dsDNA (r= 0.3, p= 0.04) y anti-cardiolipina (r= 0.3, p= 0.03) (48).

Además de lo antes descrito, también se ha reportado la capacidad de PRL para inducir la producción de auto-anticuerpos por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LEG, posiblemente mediante la activación de los linfocitos T (vía JAK2 y Stat5) mediada por la interacción de PRL con su receptor (PRL-R) (49). Dicha interacción, conduce a la producción y liberación de una variedad de citocinas incluyendo IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e interferón-α, que estimulan la proliferación y diferenciación de células B (50), por lo que estos hallazgos apoyan la teoría de que la PRL favorece la ruptura de la tolerancia inmunológica, lo cual es preponderante en LEG.

Al igual que el mecanismo anterior, se han descrito otros 3 mecanismos por los cuales PRL promueve la pérdida de tolerancia: a) incrementando la supervivencia de células B mediante la inducción de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y del receptor de BAFF, una molécula de supervivencia de células B; b) interfiriendo con los mecanismos de edición del receptor mediante la inducción de RAG1 y RAG2, las cuales son recombinasas encargadas de generar un receptor de células B (BCR) de nueva especificidad; c) disminuyendo el umbral de activación de células anérgicas, un mecanismo de supervivencia de células autoreactivas con baja afinidad a antígenos propios (51,52).

Por otra parte, se estratificaron los niveles solubles de PRL con base en pacientes con o sin afección renal y se observó que los pacientes con afección renal presentaban mayores niveles de PRL (p= 0.03), lo que apoya que la PRL también puede contribuir a mayor severidad de la enfermedad.

Una relación semejante, entre PRL y afección renal, ha sido reportada por otros estudios (20,53). Además, algunos informes sugieren que la hiperprolactinemia (HPRL) está relacionada con nefritis lúpica, ya que se han encontrado niveles elevados de PRL e IL-6 en suero y orina de pacientes con esta alteración renal en LEG (53,54).

Los mecanismos patogénicos responsables de la nefritis lúpica implican la producción de autoanticuerpos, la deposición de complejos inmunes y la activación de la cascada del complemento, lo cual es producto de la infiltración del intersticio renal por macrófagos y linfocitos B y T, que conllevan al subsecuente daño de las células renales, fibrosis intersticial y atrofia tubular (16). De acuerdo a este mecanismo, la PRL en conjunto con otras citocinas, tales como IL-6, podrían estar participando directamente en la activación y diferenciación de las células B, potenciando así, la producción de anticuerpos y la formación de inmunocomplejos.

Los resultados obtenidos en este estudio, apoyan la hipótesis de que la PRL y la IL-6 pueden activar a los linfocitos T y B que se infiltran en el tejido renal, lo que conduce a la perpetuación de la inflamación, por lo que las altas concentraciones de PRL e IL-6 que se han reportado en la orina de estos pacientes, pueden ser el resultado de la síntesis local de ambos mediadores (16).

Resumiendo los hallazgos principales, en este estudio se encontró que el alelo T del polimorfismo -1149 G>T de *PRL* es un marcador genético de susceptibilidad para LEG y se asocia con mayor daño, así como con la presencia de anticuerpos anti-RNP. Por otra parte, en LEG existe una desregulación de los niveles de PRL, con un aumento significativo en etapas iniciales de la enfermedad, lo que se asocia con la presencia de anticuerpos anti-RNP y se ve una tendencia similar para anticuerpos anti-dsDNA, anti-Ro, anti-La y anti-Sm, por lo que PRL puede ser un blanco terapéutico en etapas iniciales de esta patología.

CONCLUSIONES

- El genotipo TT del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* es un marcador de susceptibilidad para LEG de acuerdo al modelo de herencia genético recesivo y está asociado con títulos altos de Anti-RNP y mayor actividad clínica en población del Occidente de México

- Los pacientes con LEG presentan valores de prolactina más elevados que los SC, lo cual apoya la implicación de la PRL en la fisiopatología de la enfermedad

- Los niveles solubles de PRL se ven incrementados en pacientes con diagnóstico de LEG menor a un año y tienden a disminuir con el tiempo de evolución de la enfermedad, lo que sugiere que la PRL tiene un papel importante en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de LEG

- Los pacientes con LEG positivos para anti-RNP presentan altos niveles solubles de PRL, lo que sugiere que la concentración de PRL se asocia con la presencia de anticuerpos anti-RNP en LEG

- Los pacientes con LEG que cursan con manifestaciones renales presentan niveles incrementados de PRL, por lo que esta hormona puede estar participando en el daño renal característico de estos pacientes

REFERENCIAS

1. Koutsokeras T, Healy T. Systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. Nat Rev Drug Discov. 2014 Mar;13(3):173–4.

2. Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. Orphanet J Rare Dis. 2006 Mar 27;1(1):6.

3. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum. 2010 Feb;39(4):257–68.

4. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. J Rheumatol Suppl. 2011 Jan;86:3–8.

5. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2011 Dec 1;365(22):2110–21.

6. Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002 Dec;16(5):847–58.

7. Li J, May W, McMurray RW. Pituitary hormones and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2005 Dec 1;52(12):3701–12.

8. Cohen-Solal JFG, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C, et al. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. Lupus. 2008 Jun;17(6):528–32.

9. Marano RJ, Ben-Jonathan N. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. Mol Endocrinol Baltim Md. 2014 May;28(5):622–33.

10. Orbach H, Zandman-Goddard G, Boaz M, Agmon-Levin N, Amital H, Szekanecz Z, et al. Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. Clin Rev Allergy Immunol. 2012 Apr;42(2):189–98.

11. Harvey S, Arámburo C, Sanders EJ. Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview. Endocrine. 2012 Feb 1;41(1):19–30.

12. Moreno J, Varas A, Vicente A, Zapata AG. Role of prolactin in the recovered T-cell development of early partially decapitated chicken embryo. Dev Immunol. 1998;5(3):183–95.

13. Peeva E, Venkatesh J, Michael D, Diamond B. Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. Biomed Pharmacother Bioméd Pharmacothérapie. 2004 Jun;58(5):310–9.

14. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. Endocrinology. 2003 May;144(5):2102–10.

15. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2012 May;11(6-7):A465–70.

16. Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, Alcala M, Alvarez-Nemegyei J. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. Lupus. 2001;10(10):748–56.

17. Moszkorzová L, Lacinová Z, Marek J, Musilová L, Dohnalová A, Dostál C. Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol. 2002 Dec;20(6):807–12.

18. Rezaieyazdi Z, Hesamifard A. Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. Rheumatol Int. 2006 Sep 1;26(11):1036–9.

19. Pacilio M, Migliaresi S, Meli R, Ambrosone L, Bigliardo B, Di Carlo R. Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus--association with disease activity. J Rheumatol. 2001 Oct;28(10):2216–21.

20. Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, Riemekasten G, Burmester GR, Hiepe F. Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. Lupus. 2001;10(8):554–61.

21. Karimifar M, Tahmasebi A, Bonakdar ZS, Purajam S. Correlation of serum prolactin levels and disease activity in systematic lupus erythematosus. Rheumatol Int. 2013 Feb 1;33(2):511–6.

22. Buskila D, Lorber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1996 Apr;23(4):629–32.

23. Cc M, Cs L, Sc T. Prolactin profile in a cohort of Chinese systemic lupus erythematosus patients. Br J Rheumatol. 1997 Sep;36(9):986–9.

24. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2007 Sep;6(8):537–42.

25. Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin--not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc. 2012 Oct;63(5):435–43.

26. Gerlo S, Davis JRE, Mager DL, Kooijman R. Prolactin in man: a tale of two promoters. BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. 2006 Oct;28(10):1051–5.

27. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. Mol Endocrinol Baltim Md. 1994 Mar;8(3):356–73.

28. Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R, et al. Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2001 Oct;44(10):2358–66.

29. Montoya-Díaz E, Cervera-Castillo H, Chávez-Sánchez L, Legorreta-Haquet MV, Sánchez-González L, Chávez-Rueda K, et al. Prolactin promoter polymorphism (-1149 G/T) is associated with anti-DNA antibodies in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. Immunol Invest. 2011;40(6):614–26.

30. Fojtíková M, Cerná M, Cejková P, Ruzicková S, Dostál C. Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2007 May;66(5):706–7.

31. Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, Marchini M, Scorza R, Giovanna Danieli M, et al. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. Hum Immunol. 2003 Feb;64(2):274–84.

32. Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. J Rheumatol. 1992 Oct;19(10):1551–8.

33. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1996 Mar;39(3):363–9.

34. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.

35. Donn RP, Farhan A, Stevans A, Ramanan A, Ollier WER, Thomson W, et al. Neuroendocrine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. Rheumatol Oxf Engl. 2002 Aug;41(8):930–6.

36. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. Brief Bioinform. 2002 Jun;3(2):146–53.

37. Stolfa J, Fojtíková M, Cejková P, Cerná M, Sedová L, Dostál C. Polymorphism of the prolactin extrapituitary promoter in psoriatic arthritis. Rheumatol Int. 2007 Sep;27(11):1095–6.

38. Fojtíková M, Cejková P, Bečvář R, Vencovský J, Tomasová Studýnková J, Cerná M. Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis. Rheumatol Int. 2010 Nov;30(12):1691–3.

39. Reyes-Castillo Z, Pereira-Suárez AL, Palafox-Sanchez CA, Rangel-Villalobos H, Estrada-Chávez C, Oregón-Romero E, et al. The extrapituitary prolactin promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and anti-CCP antibodies in Mexican population. Gene. 2013 Aug 1;525(1):130–5.

40. Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle J f., González-Martín A, Gorostiza A, Magaña M t., Páez-Riberos L a. Genetic admixture, relatedness, and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome. Am J Phys Anthropol. 2008 Apr 1;135(4):448–61.

41. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. Biochem Medica. 2015 Feb 15;25(1):36–48.

42. Jimena P, Aguirre MA, López-Curbelo A, de Andrés M, Garcia-Courtay C, Cuadrado MJ. Prolactin levels in patients with systemic lupus erythematosus: a case controlled study. Lupus. 1998;7(6):383–6.

43. Solomou EE, Juang YT, Gourley MF, Kammer GM, Tsokos GC. Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Mar 15;166(6):4216–22.

44. Vekemans M, Robyn C. Influence of age on serum prolactin levels in women and men. Br Med J. 1975 Dec 27;4(5999):738–9.

45. Legorreta-Haquet MV, Flores-Fernández R, Blanco-Favela F, Fuentes-Pananá; EM, Chávez-Sánchez L, Hernández-González R, et al. Prolactin Levels Correlate with Abnormal B Cell Maturation in MRL and MRL/lpr Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus-Like Disease. J Immunol Res [Internet]. 2013 Nov 19 [cited 2015 Jul 13]; 2013. Available from: http://www.hindawi.com/journals/jir/2013/287469/

46. Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, Cisneros M, Medina G, Ariza R, et al. Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment. J Rheumatol. 2003 Oct;30(10):2140–6.

47. Leaños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. Rheumatol Oxf Engl. 2006 Jan;45(1):97–101.

48. Jacobi AM, Rohde W, Volk HD, Dörner T, Burmester GR, Hiepe F. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. Ann Rheum Dis. 2001 Mar;60(3):242–7.

49. Gutiérrez MA, Molina JF, Jara LJ, García C, Gutiérrez-Ureña S, Cuéllar ML, et al. Prolactin-induced immunoglobulin and autoantibody production by peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and normal individuals. Int Arch Allergy Immunol. 1996 Mar;109(3):229–35.

50. Hooghe R, Dogusan Z, Martens N, Velkeniers B, Hooghe-Peters EL. Effects of prolactin on signal transduction and gene expression: possible relevance for systemic lupus erythematosus. Lupus. 2001;10(10):719–27.

51. Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. J Clin Invest. 2003 Jan 15;111(2):275–83.

52. Saha S, Gonzalez J, Rosenfeld G, Keiser H, Peeva E. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. Arthritis Rheum. 2009 Jun 1;60(6):1743–52.

53. Miranda JM, Prieto RE, Paniagua R, Garcia G, Amato D, Barile L, et al. Clinical significance of serum and urine prolactin levels in lupus glomerulonephritis. Lupus. 1998;7(6):387–91.

54. Peterson E, Robertson AD, Emlen W. Serum and urinary interleukin-6 in systemic lupus erythematosus. Lupus. 1996 Dec;5(6):571–5.