Diane Belchior Paraiba

Estudo da atividade biológica e da expressão do gene da prolactina linfocitária e avaliação do nível de prolactina sérica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein
Co-orientador: Carlos Roberto Jorge Soares

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paraiba, Diane Belchior
Estudo da atividade biológica e da expressão do gene da prolactina linfocitária e avaliação do nível de prolactina sérica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Diane Belchior Paraíba.-- São Paulo, 2008.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.
Área de concentração: Endocrinologia.
Orientador: Marcello Delano Bronstein.
Co-orientador: Carlos Roberto Jorge Soares.

Descritores: 1.Prolactina 2.Lúpus eritematoso sistêmico 3.Hiperprolactinemia 4.Bioensaios 5.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

USP/FM/SBD-290/08

Este trabalho foi realizado:

na Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP

no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

no IPEN, onde foram realizadas as culturas celulares.

nos Laboratórios de Investigação Médica, LIM-25 e LIM-42, onde foi realizada a parte de biologia molecular.

Dedicatória

Ao meu verdadeiro amor: Maurício Prestes, marido e companheiro.

Aos meus amados pais, Ana e Lúcio.

Agradecimentos

Agradeço.....

Ao Maurício, a pessoa mais preciosa que conheci ao longo dos meus 32 anos. Obrigada, meu amor, por me amar incondicionalmente, por me admirar, apoiar e torcer sempre por mim. Por ficar do meu lado em todos os momentos. Tenho certeza que já estamos eternamente ligados. Eu dedico a você, essa nossa vitória.

À minha mãe, Ana Maria, pelo exemplo de mulher e profissional. Por ter tão especialmente me convencido a optar pela profissão que exerço hoje, que tanto amo e me orgulho, quando eu tinha apenas imaturos dezesseis anos. É um enorme privilégio ser sua filha. Obrigada por tudo!

Ao meu pai, pelo exemplo de honestidade e por ter me dado a melhor herança que um pai pode deixar para um filho: educação e dignidade. Obrigada pela sua inabalável positividade e pelo seu amor.

Às minhas queridas irmãs, Jane, Liane e Suyane, eternas companheiras, vitoriosas, motivo de muito orgulho.

Aos meus estimados sogros, Ângela e Jose Carlos, por me considerarem como filha e me tratarem como tal. Pelo carinho, apoio e compreensão, sempre.

Às minhas amadas crianças; Leonardo, Arthur, Thaís, Igor, Rafaela, Isadora e Lucas, por me transmitirem paz, esperança e alegria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Bronstein, que conheci no começo da residência de Endocrinologia. Desde então a minha admiração só cresce. Ao exemplo de médico e professor que é. Por saber ser chefe e

amigo, e se fazer respeitar pela indubitável capacidade e genialidade. Pelo poder de conseguir entusiasmar os seus alunos e nos fazer amar a neuroendocrinologia. Sou sua fã.

Aos assistentes da neuroendocrinologia, Dr Luiz Roberto Salgado, que esbanja sabedoria, com uma pitada de bom humor característica; Dra Nina Musolino e Dr Malebranche Berardo Neto, que apesar da menor convivência, tenho profundo respeito e admiração por eles.

À querida Raquel Jallad, também assistente da neuroendocrinologia, pelo acirrado exemplo de honestidade e comprometimento com a profissão e a pesquisa. Por acreditar e confiar em mim, pois é uma honra ser merecedora da sua confiança.

À minha amiga e colega estimada de ambulatório, Andréa Glezer, que eu tanto admiro, pela amizade, conselhos, apoio e ensinamentos. Por seu exemplo de humildade, mesmo sabendo ser dona de uma capacidade invejável.

Aos meus colegas da neuroendócrino; Márcio, Daniela, Felipe, Daniel e Ana Paula. É muito bom poder compartilhar um ambiente de trabalho tão qualificado, amigável e divertido.

Ao meu co-orientador, Carlos Roberto do IPEN, que conheci no início do meu doutorado e com quem tive o privilégio de viver as piores e melhores etapas do meu trabalho. Inteligente e espirituoso, sempre providenciando soluções viáveis. Exemplo de ser humano e profissional.

Aos qualificados pesquisadores do IPEN, Paolo Bartolini, Cibele, Tereza, Kayo, Miriam, Johnny. Lá, fui muito bem recebida e orientada. Com eles, aprendi o valor real da pesquisa básica.

Aos colegas do IPEN, sempre tão prestativos e amigos, Suzana, Fernanda, Renata e Zé, que muitas vezes derem “literalmente” o sangue pelo meu trabalho.

Aos pesquisadores do LIM 25, em especial à Dra Maria Lúcia Gianella, chefe deste laboratório, a Ângela e a Thaís que pacientemente me ensinaram a dar os primeiros passos na biologia molecular.

À disciplina de Reumatologia; Profa. Dra Eloísa Bonfá, e especialmente, ao Dr Eduardo Borba, assistente da reumato, que gentilmente me ajudou na seleção desta casuística, sempre solícito a esclarecer as mais variadas dúvidas, com sugestões que fizeram a diferença na construção deste trabalho. Às enfermeiras; Kátia e Rose, que realizaram todas as coletas.

Quero agradecer também ao incentivo que todos os pós-graduandos recebem da disciplina de Endocrinologia, chefiada pela Profa. Dra Berenice Bilharinho de Mendonça, que me recebeu de braços abertos no LIM 42, no final da minha tese, numa fase muito difícil. No LIM 42, apesar do pouco tempo, tive a oportunidade de conhecer pessoas muito capacitadas e prestativas, em especial, a Emília Modolo Pinto, que muito me ensinou e ajudou, e também torceu por mim; e ao meu grande amigo, Antônio Lerário, que consegue entender de “tudo um muito”, sempre solícito, com quem compartilhei muito desta trajetória.

Aos competentes e estimados secretários da Endocrinologia; Rubens, Márcia, Rosana, Cristiane e Maria Aparecida, sempre dispostos a ajudar.

Aos meus verdadeiros amigos; Raquel, Vyvianne, Katarina, Michelle, Larissa, Luci, Daniel, Bruno, Lia e Ana Cristina. É bom saber que pude e posso contar com vocês em todos os momentos. Vocês são a minha família em São Paulo.

Aos pacientes, maior razão de todo nosso trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro FAPESP, através da bolsa de doutoramento, processo n^{0} 05/51805-2, e do auxílio pesquisa n^{0} 05/51806-9, tornando possível a realização deste trabalho.

E finalmente, a Deus, uma força que não conheço e não vejo, mas consigo sentir com brutal intensidade em todos os instantes da minha vida, sempre me abençoando e providenciando soluções até mesmo para os meus mais insignificantes problemas. Por ter me escolhido para ser uma pessoa de tanta sorte e por ter colocado na minha vida todas estas pessoas tão especiais. Por mais essa grande conquista.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaboração por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução 1

1.1 Prolactina 2

1.2 Prolactina e Imunomodulação 9

1.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).....11

1.4 Hiperprolactinemia e LES.....13

2. Objetivos.....21

2.1 Primários 22

2.2 Secundários 22

3. Métodos 23

3.1 Aspectos Éticos.....24

3.2 Casuística 24

3.2.1 Grupo 1: avaliação da PRL sérica 25

3.2.2 Grupo 2: avaliação da PRL linfocitária.....26

3.2.3 Grupo controle: indivíduos normais 28

3.3 Metodologia.....28

3.3.1 Avaliação clínica (grupo 1): 28

3.3.2 Avaliação laboratorial (grupo 1):.....29

3.3.2.1 Bioquímica 29

3.3.2.2 Hormonal.....29

3.3.3 Avaliação do perfil de PRL sérica: grupo 1 30

3.3.3.1 Determinação quantitativa da PRL sérica 30

3.3.3.2 Pesquisa de macroprolactina (bbPRL).....30

3.3.4 Avaliação do perfil de PRL linfocitária: grupo 2 e controle.....31
3.3.4.1 Extração de células mononucleares 31
3.3.4.2 Bioensaios.....36
3.3.4.3 Extração do RNA total.....41
3.3.4.4 Análise da integridade do RNA total 43
3.3.4.5 Quantificação do RNA.....44
3.3.4.6 RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).....44
3.3.4.7 Integridade do produto qRT-PCR e Sequenciamento do material.....46
3.3.4.8 Método $2^{-\Delta\Delta CT}$ 47
3.4 Análise estatística 49

4. Resultados.....50

4.1 Grupo 1: avaliação da PRL sérica.....51
4.2 Grupo 2: avaliação da PRL linfocitária 57
4.2.1 Bioensaios (grupo 2 e controle).....57
4.2.1.1 Células Nb2.....58
4.2.1.2 Ba/F-LLP 66
4.2.2 RT-PCR em tempo real (grupo 2 e controle) 66

5. Discussão 70

6. Conclusões.....80

7. Anexos 82

8. Referências.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	artrite reumatóide
AZA	azatioprina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CT	*threshold cycle*
CO_2:	gás carbônico
DEPC	dietilpirocarbonato de sódio
DFC	difosfato de cloroquina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
Dr.	doutor
et al.	e colaboradores
F	feminino
FSH	hormônio folículo estimulante
g	força de gravidade, utilizada em centrifugação
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH	hormônio de crescimento
hs	horas
HEPES	M-2-hidroxietilpiperazina-N´-2-ácido etano sulfônico
IL	interleucina
IFN	Interferon
IPEN	Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares
Jak	janus quinase
LES	lúpus eritematoso sistêmico

LH	hormônio luteinizante
M	masculino
ME	mercaptoetanol
min	minutos
MMF	micofenolato de mofetil
MTS	[3(4,5-dimetilltiazol-2-yl)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolina]
MTX	metotrexate
n	número
NaCl	cloreto de sódio
$NaPO_4$	fosfato de sódio
NK	*natural killer*
O_2	oxigênio
OMS	Organização Mundial de Sáude
pág.	página
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	*polymerase chain reaction*
PEG	polietilenoglicol
PL	lactogênio placentário
PMS	fenazina metosulfato
PRL	prolactina
bPRL	prolactina dimérica (*big* prolactin)
bbPRL	macroprolactina (*big big prolactin*)
hPRL	prolactina humana
mPRL	prolactina monomérica

rPRL	prolactina recombinante
Prof.	Professor
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RPMI	meio de cultura celular: "Roswell Park Memorial Institute"
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
qRT-PCR	RT-PCR quantitativa ou em tempo real
s	segundos
SC	soro de cavalo
SFB	soro fetal bovino
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disesase Activity Index
SNC	sistema nervoso central
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
T4l	tiroxina livre
T3	triiodotironina
TSH	hormônio tireo-estimulante
TRH	hormônio liberador de TSH
UI	unidades internacionais
UTR	"untranslated region", ou seja, região não traduzida do RNA
Vol	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
γ	gama
δ	delta
Φ	fi
$=$	igual a
$\pm$	mais ou menos que
>	maior que
<	menor que
p	significância estatística
^{0}C	graus Celsius
kDa	quiloDalton
L	litro
μ	micro
mL	mililitro
mg	miligrama
M	molar
ng	nanograma
nm	namômetro
pg	picograma
%	por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica do gene da PRL humana a partir de dois promotores distintos; (aa) aminoácidos;(bp) pares de bases;(S—S) pontes dissulfídicas[7] 3

Figura 2: Esquematização da estrutura terciária da PRL humana[7].....5

Figura 3: Ilustração do processo de dimerização entre a PRL e o PRLR, com a representação dos sítios de ligação 1 e 2[7] 6

Figura 4: Ilustração dos sítios de expressão da PRL extra-hipofisária e do seu receptor em humanos[10] 7

Figura 5: Esquema representativo da sobrevivência de ratas dependentes de PRL extra-hipofisária[11] 9

Figura 6: Ilustração do preparo: sangue diluído com Ficoll-Paque® (sem misturar).....32

Figura 7: Ilustração da separação dos componentes do sangue 33

Figura 8: Ilustração dos linfócitos em câmara de Neubauer (aumento de 100x) 35

Figura 9: Ilustração dos linfócitos em cultura (aumento de 100x) 35

Figura 10: Padronização do bioensaio Nb2: meio RPMI *vs* AIM V 38

Figura 11: Bioensaio Nb2 com anticorpo anti-PRL: comprovação da presença de PRL no sobrenadante da cultura de linfócitos 39

Figura 12: Padronização do bioensaio Ba/F-LLP: meio RPMI *vs* AIM V.....41

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose: integridade do RNA (exemplo de 4 amostras).....43

Figura 14: Produtos de RT-PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%: análise dos fragmentos amplificados dos genes *GAPDH e PRL* (marcador de peso molecular: ΦX 174/HAE III).....46

Figura 15: Amplificação dos genes *GAPDH* e *PRL*, respectivamente, com diluições sucessivas de uma amostra de RNA total (grupo controle).....48

Figura 16: Curva padrão para os genes (*GAPDH e PRL*).....48

Figura 17: Curva de eficiência: genes *GAPDH e PRL* (*slope* < 1) 48

Figura 18: Grupo 1: Comparação do nível de PRL sérica entre pacientes com LES ativo (1A) e inativo(1B) – teste de Mann-Whitney (p=0,123).....55

Figura 19: Grupo 1: Comparação do nível de mPRL sérica entre pacientes com LES ativo (1A) e inativo(1B) – teste de Mann-Whitney (p=0,016).....56

Figura 20: Correlação: PRL sérica *vs* SLEDAI – análise de Spearman (p=0,189).....57

Figura 21: Ensaio 1 (Nb2): amostras (3,6 e 9) do grupo controle 59

Figura 22: Ensaio 2 (Nb2): amostras (1,2,4,5,7,8 e 10) do grupo controle...59

Figura 23: Ensaio 1 (Nb2): amostras (1,4,7,9 e 11) do grupo 2A (LES ativo) 60

Figura 24: Ensaio 2 (Nb2): amostras (2,3,5,6,8,10, 12 ao 18) do grupo 2A (LES ativo).....60

Figura 25: Ensaio 1 (Nb2): amostras (3,6,8 e 12) grupo 2B (LES inativo) ...61

Figura 26: Ensaio 2 (Nb2): amostras (1,2,4,5,7,9,10 e 11) grupo 2B (LES inativo).....61

Figura 27: Comparação da mediana da PRL linfocitária entre os grupos: teste de Kruskal-Wallis (p=0,840) 62

Figura 28: Correlação: PRL sérica *vs* PRL linfocitária – análise de Spearman.....65

Figura 29: Correlação: mPRL *vs* PRL linfocitária – análise de Spearman ...65

Figura 30: Curva de *melting*: gene *GAPDH* 67

Figura 31: Curva de *melting*: gene *PRL* 67

Figura 32: Quantificação relativa da expressão do gene *PRL*: grupo 2 (A e B) 68

Figura 33: Mediana da expressão do gene *PRL*: grupo 2A *vs* grupo 2B (teste de Mann-Whitney: p=0,122).....68

Figura 34: Correlação: expressão do gene *PRL* linfocitária *vs* nível de PRL linfocitária – análise de Spearman (grupo 2A) 69

Figura 35: Correlação: expressão do gene *PRL* linfocitária *vs* nível de PRL linfocitária – análise de Spearman (grupo 2B) 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos estudos de prevalência de hiperprolactinemia em LES 15

Tabela 2: Estudos de correlação entre a hiperprolactinemia e atividade LES [49].....16

Tabela 3a: Características Clínicas: grupo 1A (LES ativo) 85

Tabela 3b: Características clínicas: grupo 1B (LES inativo) 86

Tabela 4: Desenho dos *primers* exônicos (PRL e GAPDH).....46

Tabela 5a: Perfil de PRL do grupo 1A (LES Ativo) 52

Tabela 5b: Perfil de PRL do grupo 1B: LES Inativo 53

Tabela 6: Perfil dos hiperprolactinêmicos: grupo 1 54

Tabela 7: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo 2A (LES ativo) 63

Tabela 8: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo 2B (LES inativo).....64

Tabela 9: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo controle.....64

RESUMO

Paraíba DB. *Estudo da atividade biológica e da expressão do gene da prolactina linfocitária e avaliação do nível de prolactina sérica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 99p.

INTRODUÇÃO: Estudos indicam uma prevalência de 20 a 30% de hiperprolactinemia discreta em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), sugerindo um possível papel da prolactina (PRL) na sua etiopatogenia. Como a expressão do gene da PRL é encontrada na maioria das células do sistema imunológico, onde atua como citocina, de forma parácrina e autócrina, a origem linfocitária desta PRL tem sido aventada. OBJETIVOS: estudar a expressão do gene da PRL linfocitária de pacientes com LES em atividade e inatividade de doença e de controles normais, e sua atividade biológica em bioensaios com células Nb2 e Ba/F-LLP; Determinar o nível sérico de PRL e a prevalência de macroprolactinemia numa população nossa com LES. MÉTODOS: grupo 1, composto de 73 pacientes (66 mulheres e 7 homens), sendo 28 pacientes com LES em atividade e 45 em inatividade de doença, onde foi avaliado o nível de PRL sérica e a prevalência da macroprolactinemia; grupo 2, derivado do grupo 1, com 30 pacientes: 18 com LES em atividade e 12 em inatividade e um grupo controle com 10 indivíduos normais, dos quais foram extraídos linfócitos do sangue periférico e colocados em cultura por 72 horas. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi utilizado como amostra de PRL linfocitária em ensaios com células Nb2 (heterólogo) e Ba/F-LLP (homólogo) para avaliação da bioatividade. Os RNAs totais destes linfócitos foram extraídos e usados na RT-PCR em tempo real (método quantitativo), para comparar a expressão do gene da PRL em linfócitos de pacientes com LES em atividade e inatividade, utilizando *pool* de indivíduos normais como calibrador. RESULTADOS: hiperprolactinemia discreta foi encontrada em 21,9% (16 de 73 pacientes do grupo 1): 7 de 28 pacientes com LES em atividade (25%), e 9 de 45 em inatividade (20%). A presença de macroprolactinemia foi encontrada em 3 pacientes, todos com LES em inatividade. O nível de PRL sérica: grupo 1 (LES em atividade) teve mediana de 10,8 (4,9 – 38,9) ng/mL e o grupo 1 (LES em inatividade) mediana de 7,6 (1,9 – 49,6) ng/mL, não havendo diferença significante entre os dois subgrupos (p=0,123). No entanto, quando consideramos apenas o nível sérico da PRL monomérica, a mediana da PRL do grupo 1 (LES em inatividade) caiu para 7,3 ng/mL (1,9 – 20,6) ng/mL e assim, quando comparado novamente ao grupo 1 (LES em atividade), observamos que além de uma porcentagem maior dos casos em atividade apresentarem hiperprolactinemia, a mediana da PRL monomérica nesses pacientes é significantemente maior que nos pacientes em inatividade de doença (p= 0,016). Os bioensaios foram realizados com as amostras do grupo 2 (subgrupo do grupo 1): no ensaio com células Nb2, a bioatividade da PRL linfocitária foi semelhante, não havendo diferença

significante entre os pacientes com LES em atividade e inatividade e desses com o grupo controle. Já o bioensaio com a Ba/F-LLP não mostrou sensibilidade adequada, portanto não sendo confiável para avaliação da PRL linfocitária. O RT-PCR em tempo real apresentou expressão gênica também semelhante entre os pacientes avaliados (grupo 2). CONCLUSÕES: A expressão do gene da PRL linfocitária e a sua bioatividade foram semelhantes nos pacientes com LES em atividade e inatividade. A prevalência de hiperprolactinemia nos nossos pacientes com LES foi de 21,9%, sendo maior nos pacientes com atividade de doença. A macroprolactinemia só foi encontrada em pacientes com LES inativo, sugerindo um possível efeito protetor deste achado.

Descritores: 1.Prolactina, 2.Lúpus eritematoso sistêmico, 3.Hiperprolactinemia, 4.Bioensaios 5.Reação em cadeia de polimerase via transcripatse reversa

SUMMARY

Paraíba DB. *Study of biological activity and lymphocytic prolactin gene expression and evaluation of serum prolactin level in patients with systemic lupus erythematosus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo" São Paulo; 2008. 99p.

INTRODUCTION: Studies point to a prevalence of 20-30% of discrete hyperprolactinemia in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), suggesting a possible implication of prolactin (PRL) in the pathogenesis of this disorder. As the lymphocytic PRL gene expression is found in the majority of the immune cells, where it acts as citokine, by paracrine and autocrine regulation, the lymphocytic source of this PRL has been suggested. OBJECTIVES: 1) to study the lymphocytic PRL gene expression of patients with active and inactive SLE and normal controls, as well as its biological activity in bioassays using Nb2 (heterologous) and Ba/F-LLP cells (homologous); 2) To assess serum PRL level and the prevalence of macroprolactinemia in our population with SLE. METHODS: group 1, composed of 73 patients (66 women and 7 men), 28 patients with active and 45 with inactive SLE, where the serum PRL level and prevalence of macroprolactinemia were evaluated; group 2, a subset of group 1, with 30 patients: 18 with active and 12 with inactive SLE and 10 normal individuals as control group, from whom lymphocytes were extracted from peripheral blood and were set on culture for 72 hours. After that, the supernatant was taken as lymphocytic PRL samples in bioassays with Nb2 cells (heterologous) and Ba/F–LLP (homologous) in order to assess its bioactivity. Total RNA from these lymphocytes was extracted and a comparison was made between lymphocytic PRL gene expression of patients with active and inactive SLE by real time RT-PCR, using normal pool as calibrator. RESULTS: mild hyperprolactinemia was found in 21.9% (16 of 73 patients of group 1), 7 of 28 patients in activity (25%), and 9 of 45 in inactivity (20%). Macroprolactinemia was found in 3 patients, all with inactive SLE. Regarding serum PRL levels group 1 (active SLE) had median of 10.8 (4.9 – 38.9) ng/mL and the group 1 (inactive SLE) median of 7.6 (1.9 – 49.6) ng/mL, without significant difference between the two sub-groups (p=0.123). However, when only monomeric PRL level was considered, the median of group 1 (inactive SLE) dropped to 7.3 ng/mL (1.9 – 20.6) ng/mL and, when compared again with group 1 (active SLE), we observed that beyond a bigger percentage of the cases in activity to present hyperprolactinemia, the medium of serum PRL level in patients with active SLE is significantly greater of that in the ones in inactivity (p= 0.016). The bioassays with the samples of group 2 (sub-group of group 1): The assays with Nb2 cells showed similar lymphocytic PRL bioactivity. They did not have significant difference between patients with SLE active and inactive and these with normal control group. The assays with Ba/F-LLP cells did not show adequate sensitivity, so not trustworthy for lymphocytic PRL evaluation. The real time

RT-PCR also presented similar gene expression between patients (group 2). CONCLUSIONS: The gene lymphocytic PRL expression and its bioactivity were similar in patients with SLE in activity and inactivity of illness and the normal controls. The prevalence of hyperprolactinemia in our population of patients with SLE was of 21.9%, being greater in patients with active SLE. The macroprolactinemia was found only in patients with inactive SLE, suggesting a possible protective effect of this finding.

Descriptors: 1.Prolactin 2.Systemic lupus erythematosus 3.Hyperprolactinemia 4.Bioassays 5.Reverse transcriuptase polymerase chain reaction

1. Introdução

1.1 Prolactina

A prolactina (PRL) humana é um hormônio polipeptídico, sintetizado e secretado por células especializadas da hipófise anterior, os lactotrofos. A secreção deste hormônio é controlada por fatores inibidores e estimuladores e, diferentemente dos outros hormônios hipofisários, o controle inibitório é o predominante. Sua secreção pode ser estimulada por diversos fatores tais como hormônio liberador de tireotrofina (TRH), serotonina, substância P e diversas interleucinas [1,2,3]. Sua inibição é devida principalmente à dopamina de origem hipotalâmica, sendo outros exemplos de fatores inibidores a somatostatina, o neuropeptídeo Y e o peptídeo natriurético atrial.[1]

O hormônio foi nomeado "prolactina" (PRL) após a comprovação de sua capacidade de promover o crescimento e a diferenciação do papo de pombos bem como de promover a lactação em coelhos, em 1933[1,4]. Logo depois, em 1937, foi publicado no *The New York Times*, que "a PRL era a chave de um pedaço do mundo" [5]. No entanto, somente em 1971, a PRL foi finalmente isolada e purificada, com o desenvolvimento de um radioimunoensaio específico para a mesma, pois, até então, o hormônio de crescimento (GH), por ter efeitos lactogênicos e ser ativo nos bioensaios utilizados, era indistinguível da PRL[6].

A PRL, o GH e os lactogênios placentários (PL) formam uma família de hormônios que provavelmente resultam da duplicação de genes ancestrais;

entretanto, no genoma humano, apenas um gene localizado no cromossomo seis codifica a PRL. O gene da PRL, com 10 Kb, é composto por cinco exons e quatro introns. A transcrição deste gene é regulada por duas regiões promotoras independentes, sendo a proximal responsável pela transcrição do RNAm da PRL hipofisária e uma região mais distal responsável pela da PRL extra-hipofisária. No entanto, a proteína traduzida, a PRL, é exatamente a mesma[1,4] (Figura 1).

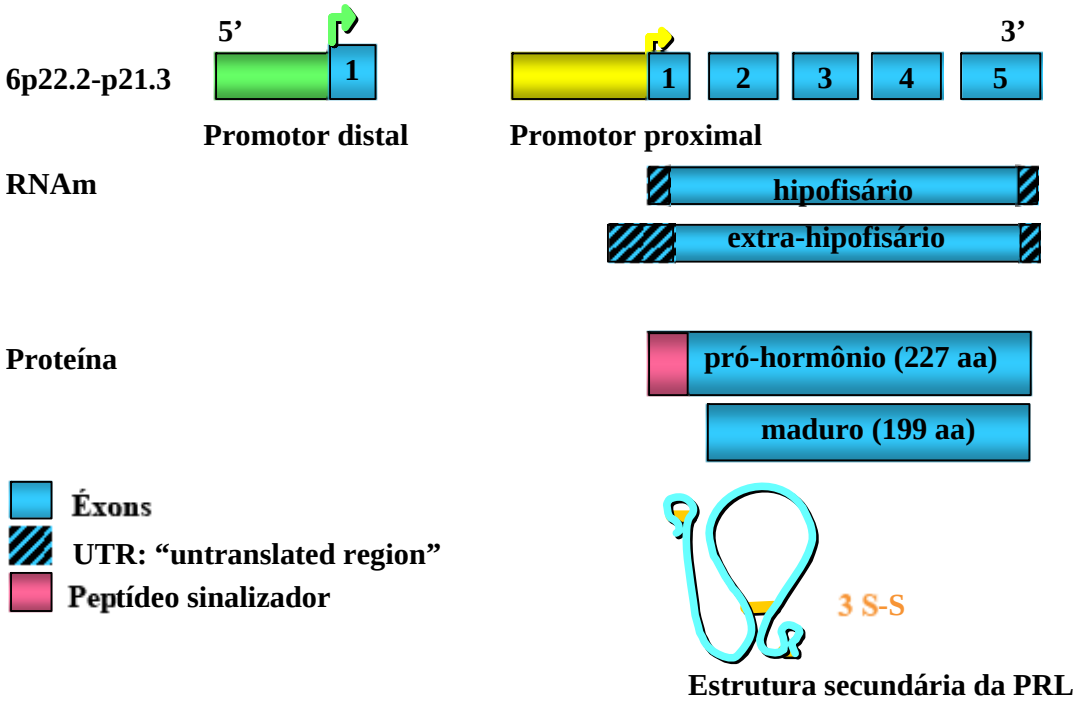

Figura 1: Representação gráfica do gene da PRL humana a partir de dois promotores distintos; (aa) aminoácidos;(bp) pares de bases;(S—S) pontes dissulfídicas[7]

O DNA complementar (cDNA) da PRL humana codifica um pró-hormônio de 227 aminoácidos (aa), sendo que o peptídeo sinalizador contém 28 aa, tendo portanto o hormônio maduro 199 aa, o que lhe confere massa molecular de aproximadamente 23.000 Da (~23 kDa)[1]. No entanto, a PRL pode sofrer vários processos pós-traducionais, incluindo agregação molecular, glicosilação, acetilação, deaminação e proteólise, e circular na corrente sanguínea em várias isoformas classificadas como: PRL monomérica (mPRL), com massa molecular de 23 kDa, ou como prolactina dimérica (ou “big prolactin”, bPRL), com aproximadamente 45-60 kDa, ou ainda macroprolactina (ou “big-big prolactin” bbPRL), com mais de 100 kDa. Na maioria dos indivíduos normais e hiperprolactinêmicos, a forma mais prevalente é a mPRL, responsável por mais de 80% da PRL circulante. O termo macroprolactinemia é utilizado para os casos em que a bbPRL é a isoforma mais prevalente[8].

Em 2003, foi determinada a estrutura terciária da PRL, que é composta por quatro α hélices antiparalelas, como ilustra a figura 2, demonstrada por estudos com ressonância magnética[9].

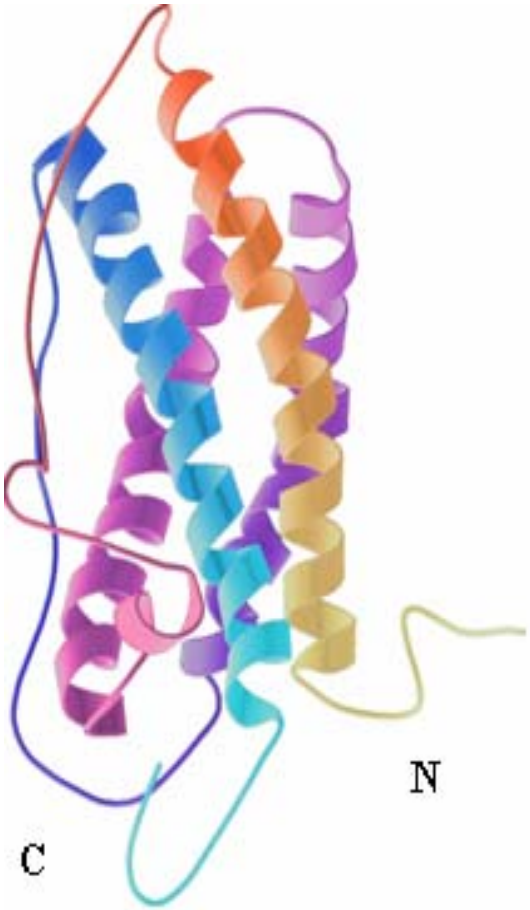

Figura 2: Esquematização da estrutura terciária da PRL humana[7]

A PRL está presente em todos os vertebrados, exercendo funções diversas e vitais [4]. Ela é mais implicada nos processos fisiológicos do que todos os outros hormônios hipofisários combinados, exercendo mais de 300 diferentes funções, sendo a sua ação mais evidente a promoção do desenvolvimento adicional da glândula mamária, garantindo produção de leite durante a gravidez e lactação[7]. Outros efeitos importantes que podem estar presentes nos vertebrados de um modo geral incluem balanço hidroeletrolítico, reprodutivo, metabólico, comportamento materno e imunomodulação, entre outros [4]. Nos seres humanos, a função da PRL é apenas comprovada e totalmente conhecida na lactação.

Considera-se que a PRL tenha ação dupla, como hormônio e citocina, sendo a diversidade dessas ações atribuída a três componentes: polimorfismo estrutural, locais de produção (hipofisária e extra-hipofisária) e vias de sinalização intracelular divergentes[1,4,10].

O gene do receptor da PRL é membro da superfamília de receptores de citocina classe I, estando localizado no cromossomo 5, contendo dez exons. O receptor de PRL (PRLR) é caracterizado por uma proteína transmembrana, isento de atividade autofosforilativa, que necessita de ligação entre o ligante e duas subunidades do receptor, com sítios de ligações distintos, para que haja sua ativação. Este processo é conhecido por "dimerização"[4] (Figura 3). O PRLR, quando ativado, induz a fosforilação e a ativação de Janus quinase 2, demonstrando grande semelhança funcional com receptores de outras citocinas[4].

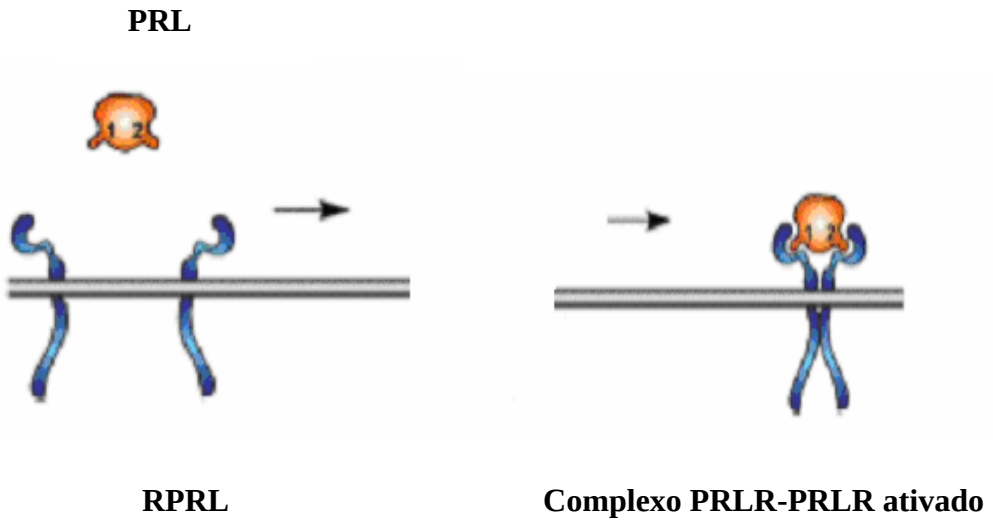

Figura 3: Ilustração do processo de dimerização entre a PRL e o PRLR, com a representação dos sítios de ligação 1 e 2[7]

A expressão do gene da PRL, assim como a do seu receptor, já tem sido confirmada também em vários outros sítios, tais como cérebro, miométrio, glândula lacrimal, timo, baço, células epiteliais mamárias, fibroblastos, linfócitos circulantes e células linfóides da medula óssea, entre outros. A PRL pode ser encontrada também nos mais diversos compartimentos fluídos além do sangue, como líquor, leite materno, suor e líquido amniótico[10] (Figura 4).

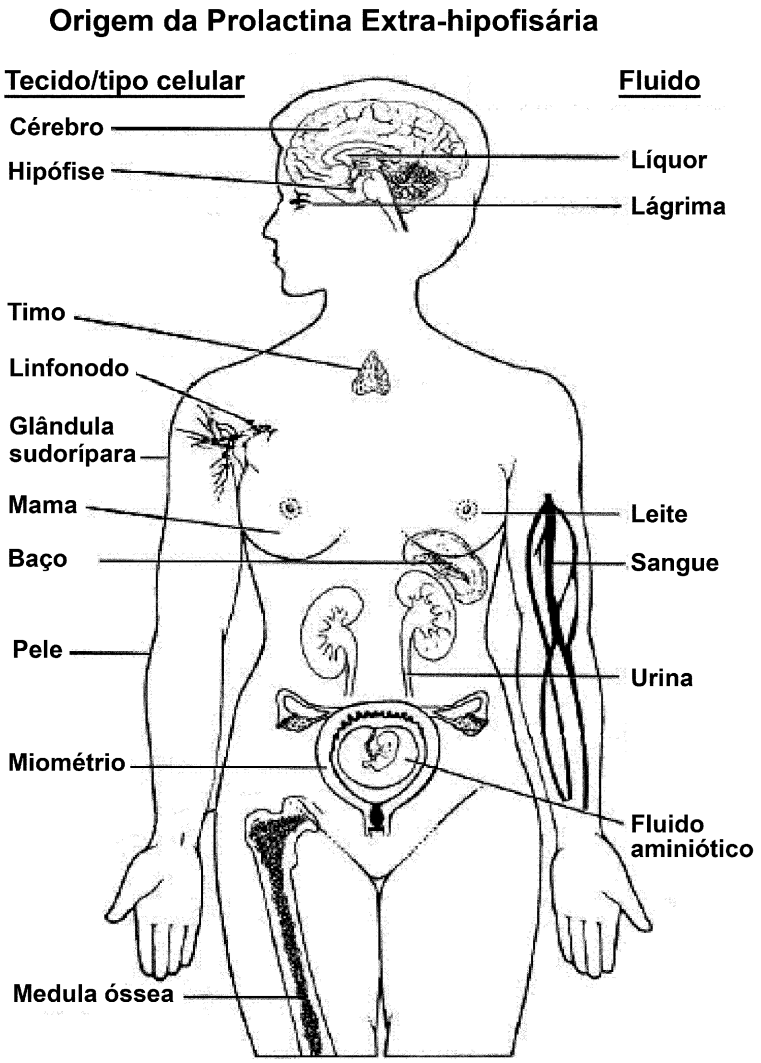

Figura 4: Ilustração dos sítios de expressão da PRL extra-hipofisária e do seu receptor em humanos[10]

A PRL hipofisária é sempre citada como modelo quando se discutem mecanismo de ação, regulação gênica, heterogeneidade molecular e estrutura de receptores, sendo esses aspectos já bem conhecidos na literatura. A PRL hipofisária age por via clássica, isto é, uma vez secretada pela glândula, é transportada via circulação, agindo nas células-alvo através de receptores de membrana, desencadeando uma série de eventos próprios desse hormônio, como a lactação.

Entretanto, a PRL que é produzida pelos diferentes tipos de células citados anteriormente pode agir de diversas maneiras, tais como: fator de crescimento, neurotransmissor, ou imunomodulador. Portanto, se for localmente produzida, pode agir nas células adjacentes (ação parácrina) ou nas próprias células que a produzem (ação autócrina). Através desses mecanismos parácrinos e autócrinos, a PRL exerce várias de suas ações sem afetar, no entanto, a concentração sérica desse hormônio[4].

Nagy e Berczi demonstram atenção especial à PRL extra-hipofisária, reportando que ratas quando hipofissectomizadas permaneciam ainda com 10% a 20% da atividade lactogênica comparadas aos controles. Dentro de dois meses, esta atividade gradualmente aumentava para 50%. A imunoneutralização da PRL nessas ratas hipofissectomizadas reduzia marcadamente a atividade lactogênica, causando deficiências imunológicas múltiplas e morte (Figura 5). Esses achados elucidam funções vitais da PRL, provavelmente, pelo menos em parte, através de compensação extra-hipofisária[11].

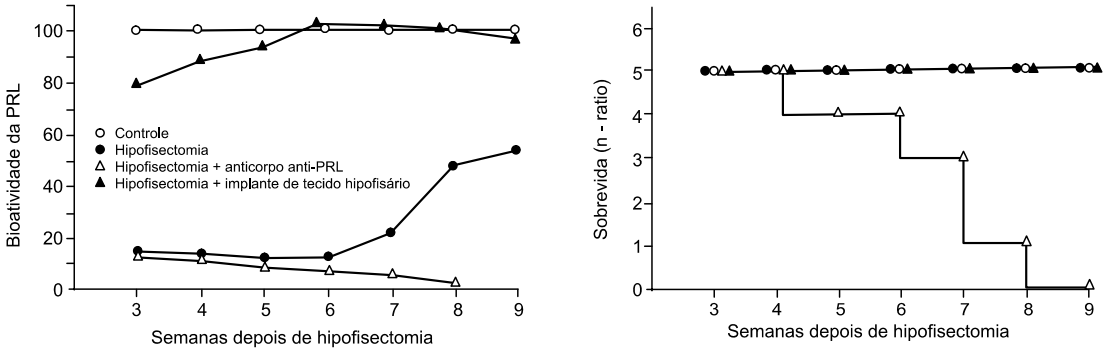

Figura 5: Esquema representativo da sobrevivência de ratas dependentes de PRL extra-hipofisária[11]

Os sítios extra-hipofisários de produção de PRL são principalmente o cérebro, os órgãos da reprodução e o sistema imunológico[10].

1.2 Prolactina e Imunomodulação

Muitos estudos sugerem o papel da PRL[12,13] como um fator importante na imunomodulação, mas ainda não se sabe a real implicação deste "hormônio-citocina" no complexo sistema imunológico.

A ligação da PRL com linfócitos foi primeiramente demonstrada por Russel e colaboradores, em 1985[14], e subseqüentemente estudos detectaram receptores de PRL em aproximadamente 20% de esplenócitos de ratos, usando anticorpos anti-PRLR[15]. Desde então, vários trabalhos já confirmaram a presença da expressão do RNAm da PRL e do seu receptor em humanos, na maioria das linhagens de células do sistema imunológico,

tais como timócitos, esplenócitos, macrófagos, células polimorfonucleares e principalmente linfócitos[16-20].

As células Nb2 (linhagem de células derivadas de linfoma de rato) são as que possuem maior densidade de receptores, cerca de 12 mil receptores por célula (sendo daí a mais utilizada em bioensaio da PRL por sua alta sensibilidade), seguida pelos linfócitos primários, que possuem por volta de 1.000 a 2.000 receptores por célula[20]. Dentre os linfócitos humanos do sangue periférico, as células B expressam alta densidade de receptores de PRL, enquanto as células T apresentam baixa densidade.

Entretanto, a expressão do receptor de PRL por células T eleva-se rapidamente com o aumento da atividade mitogênica. Após essas comprovações, várias outras publicações mostraram as ações da PRL produzida localmente: estímulo para crescimento e diferenciação dos timócitos[21,22]; inibição de apoptose dos linfócitos, aumentando a sobrevida desta linhagem, além de funcionar como estímulo mitogênico para estas células[23]; sinergismo com a IL-2, aumentando a expressão de receptores desta citocina e também de interferon γ em células linfóides; proliferação de células *natural killer* (NK)[4,10], além de estimular produção de anticorpos por linfócitos humanos e de ratos[24]. Sugere-se que mantenha a sobrevida e a função de linfócitos T quando expostos a grandes quantidades de glicocorticóides[25].

Por outro lado, dois estudos mostram que tanto a deficiência de PRL quanto a deficiência do seu receptor em camundongos não alteram a hematopoiese[26,27].

Mais recentemente, uma revisão revela que a produção, a distribuição, as funções fisiológicas e fisiopatológicas e a regulação da PRL podem diferir entre as espécies, ou seja, estudos com ratos e camundongos podem ter diferenças de respostas até mesmo entre eles. Entretanto, não necessariamente representam o que de fato ocorre em humanos, devendo ser cuidadosamente avaliados antes de terem seus resultados extrapolados[28].

Em resumo, o espectro completo das funções imunológicas da PRL ainda não é totalmente conhecido e muito controverso na literatura. No entanto, existem evidências de que níveis fisiológicos de PRL circulante são necessários para manter a competência imunológica, sendo tanto a hipoprolactinemia como a hiperprolactinemia implicadas em danos imunológicos, podendo ocorrer imunossupressão ou desenvolvimento de auto-imunidade, respectivamente [28].

1.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é doença inflamatória crônica de caráter auto-imune e etiologia desconhecida, na qual os órgãos e tecidos podem ser danificados por auto-anticorpos e imunocomplexos, em intensidade variável, muitas vezes de forma grave[29].

Sua prevalência é de um para cada 1000 indivíduos da raça branca, acometendo com maior freqüência pessoas da raça negra, ou seja, um para

cada 250 indivíduos. Já foi descrita em todas as etnias e nas diferentes áreas geográficas[30].

Noventa por cento dos casos são do sexo feminino, principalmente em idade fértil, mas pode acometer também crianças e mulheres na menopausa numa menor proporção[29].

A patogênese desta doença permanece obscura, sendo sugerida uma origem multifatorial. O componente genético merece destaque, por ser uma doença mais freqüente em determinados grupos étnicos, sendo os haplótipos dos antígenos de histocompatibilidade, tanto de classe I (B8) como de classe II (DR3, DR2, DQw1 e DQw2), que se localizam no braço curto do cromossomo 6, os mais frequentemente implicados. Esses achados podem explicar a maior incidência de LES ou outras doenças auto-imunes em parentes próximos.

A participação do estrógeno na patogênese sempre foi aventada, por acometer mais frequentemente mulheres na idade fértil, reforçada por modelos animais com ratos NZB/NZW (próprios para o desenvolvimento de LES), onde as fêmeas que eram castradas no início da vida e tratadas posteriormente com andrógenos eram protegidas da forma grave da doença.

Alguns agentes infecciosos também podem estar envolvidos. Os mixovírus, parvovírus, vírus Epstein-Barr entre outros já foram estudados, pois há relatos de inclusões intra-celulares semelhantes ao vírus nas paredes do vasos e na membrana glomerular de pacientes com LES, mas não parecem ser específicos da doença, podendo ser apenas um “gatilho” para o desenvolvimento da mesma[30].

O quadro clínico é polimórfico e pode variar entre os pacientes e ao longo da vida, em geral, nos primeiros cinco anos são definidos os locais principais de acometimento. As articulações e a pele são mais frequentemente acometidas, sendo mais grave o envolvimento renal e do sistema nervoso central [29,30].

O diagnóstico é baseado em critérios clínicos e laboratoriais[31] (Anexo 1), devendo o paciente apresentar pelo menos quatro critérios para ser definido o LES.

O tratamento deve ser individualizado dependendo dos órgãos acometidos. Em geral, altas doses de glicocorticóides e drogas imunossupressoras são requeridas, pelo menos em algum período da vida do paciente, ou às vezes, continuamente [29,30].

1.4 Hiperprolactinemia e LES

Evidências derivadas de modelos animais e reforçadas por algumas observações clínicas sugerem que a PRL pode influenciar o curso de doenças auto-imunes [32-35].

A hiperprolactinemia foi primeiramente demonstrada em pacientes do sexo masculino com LES, ainda na década de 80[36]. No início dos anos 90, o grau de hiperprolactinemia foi implicado na atividade de doença em pacientes gestantes com LES e um estudo mais recente, em 2007,

corrobora esta afirmativa [37,38]. Desde então, vários trabalhos têm correlacionado níveis elevados de PRL sérica com atividade de outras doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide (AR), quando comparados com pacientes em inatividade da doença e com controles normais[39,40] e ainda com a polimialgia reumática, tendo esta última apenas correlação clínica com nível sérico de PRL, e não com marcadores laboratoriais de atividade da doença[41]. Já foram também relacionadas com hiperprolactinemia as seguintes doenças auto-imunes: esclerose múltipla, diabetes mellitus tipo 1, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, hipofisite linfocítica e doença de Addison[42].

Associações do nível de PRL com aumento de anticorpos anti-DNA, anti-Ro e anti-La foram também reportadas[43]. Além disso, uma publicação recente também aponta maior prevalência de auto-anticorpos contra a tireóide (anti- tireoperoxidade e anti-tireoglobulina) em pacientes com LES hiperprolactinêmicos do que nos LES normoprolactinêmicos [44]. Esses dados apóiam a hipótese de que a PRL pode estar implicada na patogênese de doenças auto-imunes como o LES.

Nos últimos dez anos, houve aumento substancial de publicações que relatam a existência de hiperprolactinemia discreta em pacientes com LES, sem a presença de outras causas consistentes de aumento de PRL, como drogas, hipotireoidismo, insuficiência renal ou hepática e tumores da região hipotálamo-hipofisária. Esses pacientes, em geral, não apresentam sintomas relacionados à hiperprolactinemia (galatorréia e hipogonadismo).

Aproximadamente de 20% a 30% dos pacientes com LES expressam algum grau de hiperprolactinemia[45]. A tabela 1 reúne alguns exemplos:

Tabela 1: Resumo dos estudos de prevalência de hiperprolactinemia em LES

ESTUDO	N (PACIENTES)	HIPERPRL (%)
Vera-Lastra, 2003[45]	43	69,7
Moszkorzova, 2002[46]	80	40
Pasoto, 2002[47]	36	8
Jara, 2001[48]	43	69
Pacilio, 2001[49]	78	26,9
Jacobi, 2001[50]	60	28,3
Jara, 1991[51]	45	22
Média ± DP	**55 ± 17,9**	**37 ± 0,2**
Mediana	**45 (36 – 80)**	**28,3 (8 – 69,7)**

Entretanto, ainda não é consenso que a hiperprolactinemia esteja implicada na atividade de doença, pois, enquanto alguns trabalhos mostram correlação positiva e estatisticamente significante entre o nível de PRL sérica e LES em atividade, outras publicações não corroboram esses dados (Tabela 2)[49].

Tabela 2: Estudos de correlação entre a hiperprolactinemia e atividade LES [49]

Autores	Pacientes com LES (PRL sérica > 20 ng/mL, %)	Pacientes M/F	Correlação com atividade de doença
Jara	22,2	0/45	Sim
Pauzner	19,5	12/70	Não
Buskila	15,9	4/59	Não
Ostendorf	2,2	14/168	Não
Mok	35	3/69	Não
Pacilio	30,6	3/46	Sim
Rovensky	31	4/31	Não
Ferreira	37,5	1/23	Não
Miranda	42	1/25	Sim
Scali	18	168	Sim
Zoli	20	0/20	Sim

Esses achados divergentes podem decorrer a partir de diversos fatores, tais como heterogeneidade dos pacientes lúpicos estudados, diferença de tratamentos, duração da doença, índices variáveis para avaliação de atividade da doença, discrepância entre os métodos laboratoriais de dosagem de PRL[46] e ainda presença de diferentes isoformas desse hormônio, com bioatividades distintas, como a macroprolactina (bbPRL). Esta última foi relacionada recentemente a um “efeito protetor” em pacientes com LES, por ter sido mais freqüentemente encontrada nos indivíduos em inatividade de doença[52,53], o que talvez possa ser explicado

pela menor bioatividade dessa isoforma de PRL (bbPRL)[8]. A ligação da PRL monomérica com seu anticorpo é considerado o principal mecanismo gerador da macroprolactina[54].

Outra questão ainda muito controversa se refere à origem da hiperprolactinemia: hipofisária ou extra-hipofisária (linfocitária). Foram publicados quatro casos de mulheres com hiperprolactinemia de origem hipofisária (3 microprolactinomas e uma hiperprolactinemia não-tumoral ou idiopática) que desenvolveram LES ao longo do acompanhamento. Houve melhora da atividade de doença em todos os casos, quando a hiperprolactinemia foi devidamente controlada com uso do agonista dopaminérgico (bromocriptina).

Adicionalmente, uma publicação descreve uma paciente pediátrica com os diagnósticos de LES e macroprolactinoma cístico, ambos descobertos concomitantemente, que obteve melhora dramática dos sintomas da atividade lúpica após cirurgia transesfenoidal seguida de remissão do prolactinoma.

Estes relatos sugerem que a hiperprolactinemia de origem hipofisária poderia ser um “gatilho” para desenvolvimento de LES [55,56].

No entanto, o contrário não foi provado, ou seja, pacientes portadores de LES geralmente não apresentaram prolactinomas. Com efeito, uma revisão recente mostrou três casos de associação entre as duas doenças (prolactinoma e LES), nos quais não foi consistente a relação entre hiperprolactinemia tumoral e atividade de LES[57].

Ainda cogitando que a hiperprolactinemia de origem hipofisária *per se* poderia ser um “gatilho” para o desenvolvimento dessa doença auto-imune, uma situação que pode provar o contrário é a gravidez em mulheres saudáveis, uma condição fisiológica de hiperprolactinemia de origem hipofisária, na qual não foi descrita uma relação causal com o desenvolvimento de LES, como acontece na hipofisite linfocítica[58]. Especificamente em mulheres com LES, a gestação não necessariamente leva à piora da atividade lúpica. A piora nestas pacientes gestantes é devido a algumas condições existentes no período pré-gestacional, como hipertensão não controlada, insuficiência renal, acometimento cardíaco, gravidez múltipla, presença de anticorpo anti-fosfolípide, anti-Ro e anti-LA [59].

Em contrapartida, como descrito anteriormente, a existência da expressão de PRL na maioria das células imunológicas, podendo exercer diversas funções locais, quando traduzida, para perpetuar o processo inflamatório, aponta para a origem linfocitária da hiperprolactinemia em pacientes com doença auto-imune. Na literatura, pouco se sabe sobre o real envolvimento da PRL linfocitária. Alguns trabalhos mostram, de forma indireta, a sua ação: a publicação de Chavez-Rueda[60] e colaboradores, em 2007, demonstraram que a PRL humana *in vitro* estimula a expressão e a ativação de linfócitos de pacientes com LES. A regulação da PRL linfocitária também é uma questão em aberto, pois, como esta é regulada por uma região promotora alternativa (distal), independente do PIT-1 e ligada a diferentes fatores de transcrição, não é inibida pela dopamina [61,62]. Por outro lado, é sugerido que pacientes com LES tenham um tônus dopaminérgico

aumentado à custa do aumento da PRL linfocitária, e com isso mantenham o nível de PRL sérica dentro do limite de normalidade ou apenas discretamente aumentado[63].

A possibilidade da presença de um polimorfismo no gene da PRL estar implicado na patogênese do LES[64] não foi confirmada posteriormente[65].

A literatura descreve estudos em animais e alguns protocolos clínicos com uso de bromocriptina em indivíduos com LES. Um trabalho com pequena amostra de pacientes mostrou que o uso deste agonista dopaminérgico induziu remissão em pacientes com LES em atividade que, após suspensão da droga, cinco dos sete pacientes do estudo tornaram-se novamente hiperprolactinêmicos e com recorrência da atividade da doença[66]. Em modelos experimentais com ratos protótipos para desenvolvimento de LES (NZBxNZW), a bromocriptina foi efetiva em induzir controle e retardar evolução da doença nesses animais[67]. Um estudo piloto aberto com gestantes lúpicas, divididas em dois grupos, um em uso de bromocriptina (2,5 mg/dia) e prednisona (10 mg/dia), e outro apenas com prednisona (10 mg/dia), mostrou que o primeiro teve menos complicações materno-fetais (abortamento, descolamento prematuro de placenta, pré-eclâmpsia, entre outros) do que o grupo sem a bromocriptina[68].

A bromocriptina ainda não é autorizada para uso rotineiro em pacientes com LES, o que significa que novos dados precisam ser publicados para suportar o uso dessa medicação nesses casos.

Cárdenas-Mondragón e colaboradores[69] publicaram um estudo com 98 pacientes com LES em atividade e inatividade de doença e mostraram

que a bioatividade da PRL sérica dos indivíduos com LES em atividade foi maior que a dos em inatividade, sendo esse achado estatisticamente significante apenas quando usados ensaios homólogos, a partir de células portadoras do receptor humano da PRL (Ba/F-LLP e 293HEK). Em contrapartida, foi evidenciado que os pacientes portadores de macroprolactinemia apresentaram menos atividade de doença e menor bioatividade da bbPRL *in vitro*.

Todos esses dados sugerem a hipótese de que a produção de PRL pelos linfócitos possa estar implicada na atividade das doenças auto-imunes. Portanto, devido tanto à morbidade da própria doença, no caso LES, como também aos efeitos colaterais relevantes das drogas atualmente disponíveis para o tratamento desse distúrbio, torna-se importante a avaliação do papel da PRL na sua etiopatogenia, visando o potencial emprego de drogas agonistas dopaminérgicas. Adicionalmente, o detalhamento das isoformas mais prevalentes e a verificação da origem desta PRL (se hipofisária ou linfocitária) podem trazer novos dados para o uso terapêutico dessas drogas e ainda abrir caminhos para o desenvolvimento de outros medicamentos para tratamento específico, tais como um antagonista do receptor da PRL[70].

2. Objetivos

2.1 Primários

- Estudar a secreção da PRL linfocitária de pacientes com LES em atividade e inatividade de doença, e da sua atividade biológica em bioensaios com células Nb2 e Ba/F-LLP, comparando com o controle normal; e

- Avaliar e correlacionar a expressão do gene da PRL em células mononucleares (linfócitos) extraídas de pacientes com LES em atividade e inatividade de doença.

2.2 Secundários

- Determinar o nível sérico de PRL em um grupo de pacientes com LES em atividade e inatividade de doença; e
- Verificar a prevalência de macroprolactinemia nesses pacientes e correlacioná-la com atividade e inatividade de doença.

3. Métodos

3.1 Aspectos Éticos

Em concordância com as diretrizes éticas internacionais para pesquisas com seres humanos, este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq n^0 852/04). Todos os indivíduos que participaram deste estudo foram devidamente informados a respeito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Casuística

Estudamos dois grupos de pacientes (1 e 2) neste trabalho. O grupo 2 é na verdade um subgrupo do 1, e corresponde aos objetivos 1 e 2 (primários) descritos anteriormente. O grupo 1 é mais amplo e foi avaliado apenas do ponto de vista epidemiológico, correspondendo aos objetivos 3 e 4 (secundários). Ambos os grupos foram formados por pacientes com LES em atividade e inatividade de doença. Esta divisão e a ordem que será apresentada a seguir tornam o texto mais didático, apesar da ordem dos objetivos ser a inversa. Os grupos estão descritos detalhadamente a seguir.

3.2.1 Grupo 1: avaliação da PRL sérica

Selecionamos indivíduos portadores de LES, com diagnóstico estabelecido de acordo com os critérios diagnósticos publicados pelo American College of Rheumatology em 1982 e revisados em 1997 com 98% de especificidade e 97% de sensibilidade [31,71] (Anexo1,), em atividade e inatividade de doença, classificados de acordo com escores baseados no índice SLEDAI (**S**ystemic **L**upus **E**rythematosus **D**isesase **A**ctivity **I**ndex), pelo qual SLEDAI zero configura o paciente com LES em inatividade de doença e SLEDAI ≥ 1, configura o paciente com LES em atividade de doença[72] (Anexo 2). Todos os indivíduos estavam rmatriculados no ambulatório de Reumatologia da Disciplina de Reumatologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC/FMUSP).

Neste grupo, avaliamos um total de 73 pacientes com LES, com mediana de idade de 37 anos (20 - 66 anos), sendo 66 do sexo feminino (90,4%) e apenas 7 do sexo masculino (9,6%). Este montante foi subdivido em:

- **grupo 1A (LES ativo)**, com 28 pacientes (38,4% do total), com mediana de idade de 31 anos (20 – 66 anos), sendo todos do sexo feminino, com índice de atividade (SLEDAI) variando de 3 a 23, com mediana de 8;
- **grupo 1B (LES inativo)**, com 45 pacientes (61,6% do total), com mediana de idade de 40 anos (20 – 66 anos), sendo 38 do sexo feminino e apenas 7 do sexo masculino, todos, obviamente, com SLEDAI zero.

Faziam uso de medicação específica para tratamento do LES 66 pacientes deste grupo (90,4%).

As características clínicas detalhadas destes pacientes estão dispostas no anexo 3, tabelas 3a e 3b.

Avaliamos estes pacientes apenas sob o ponto de vista da PRL sérica, determinamos assim o nível da PRL sérica e a prevalência de hiperprolactinemia e de macroprolactinemia em uma população nossa com LES, em atividade e inatividade de doença.

Excluímos gestantes, lactantes, pacientes em uso de medicações que sabidamente elevam o nível de PRL sérica ou com diagnóstico anterior ou recente de prolactinoma ou tumor hipofisário com desconexão hipotálamo-hipofisária e hipotireoidismo descompensado como causa de hiperprolactinemia. Excluímos também os pacientes portadores de insuficiência renal, cirrose hepática, síndrome dos ovários policísticos (SOP), patologias relacionadas ao aumento de PRL sérica. Pacientes do sexo feminino na menacme com irregularidade menstrual, amenorréia, galactorréia e do sexo masculino com testosterona baixa, ou seja, sintomas clássicos de hiperprolactinemia sintomática, que pudesse apresentar um dos diagnósticos citados acima, também foram excluídos.

3.2.2 Grupo 2: avaliação da PRL linfocitária

Este grupo é um subgrupo do grupo 1, portanto obedeceram aos mesmos critérios de seleção e exclusão, somando-se ainda a exclusão das mulheres na menopausa, e os pacientes nos quais não foi possível a

obtenção de material adequado, sendo selecionado propositalmente um número menor de pacientes para que fosse possível a realização de todas as etapas descritas a seguir.

Selecionamos 30 pacientes do total de 73 do grupo 1 para formar este grupo denominado grupo 2, com mediana de idade de 32 (20 – 48) anos, sendo 27 do sexo feminino (90%) e três do sexo masculino (10%). Dividimos este grupo também em subgrupos:

- **grupo 2A (LES ativo)**, com 18 pacientes (60% do grupo 2), com mediana de idade de 26 (20 – 42) anos, sendo todos do sexo feminino, com índice de atividade (SLEDAI) variando de 4 a 23, com mediana de 8,5;
- **grupo 2B (LES inativo)**, com 12 pacientes (40% do grupo 2), com mediana de idade de 39 (27 – 48) anos, sendo 9 do sexo feminino e apenas 3 do sexo masculino, todos, obviamente, com SLEDAI zero.

No subgrupo LES ativo entraram somente os pacientes com SLEDAI ≥ 4, obedecendo assim um critério mais rigoroso de atividade para não haver sobreposição entre pacientes do grupo em atividade e em inatividade de doença.

Faziam uso de medicação para tratamento específico do LES 25 pacientes da totalidade do grupo 2 (83,3%).

As características clínicas detalhadas destes pacientes estão dispostas no anexo 3, tabela 3a, pacientes: 1 ao 18; e anexo 3, tabela 3b, pacientes: 1 ao 12.

3.2.3 Grupo controle: indivíduos normais

Selecionamos um grupo de 10 indivíduos normais: nove mulheres e um homem, com mediana de idade de 31,5 (24 - 42) anos e mediana de PRL sérica de 6,4 (2,4 – 10,3) ng/mL, todos sadios, sendo alguns colegas da pós graduação e alguns funcionários do Hospital das Clínicas sem uso de quaisquer medicações. Este grupo foi utilizado para comparação nos bioensaios e para a formação do *pool* de RNAs normais a ser utilizado como calibrador nas reações de RT-PCR em tempo real.

3.3 Metodologia

3.3.1 Avaliação clínica (grupo 1):

Anamnese, incluindo pesquisa de sinais e sintomas secundários à hiperprolactinemia sintomática, portanto todos os pacientes selecionados neste estudo tiveram todas as causas conhecidas de hiperprolactinemia devidamente descartadas. Avaliação clínica rotineira do ambulatório de reumatologia para pesquisa de sinais e sintomas de atividade lúpica e, juntamente com exames laboratoriais de rotina deste mesmo ambulatório, calcular o SLEDAI (Anexo 2) e classificar o paciente em atividade ou inatividade de doença.

3.3.2 Avaliação laboratorial (grupo 1):

3.3.2.1 Bioquímica

- Determinação sérica de uréia e creatinina: descartar insuficiência renal;
- Determinação sérica das aspartato e alanina aminotransferases e proteínas totais e frações: descartar alteração hepática moderada a grave.

Estas dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.3.2.2 Hormonal

- Determinação do βhCG, para descartar gestação ;
- Avaliação da função tireoidiana (TSH e T4 livre) para descartar hipotireoidismo descompensado como causa de hiperprolactinemia;
- Determinação das gonadotrofinas (FSH e LH);
- Nos homens: dosagem da testosterona total; para descartar causas de hiperprolactinemia sintomática;
- Nas mulheres: dosagem do estradiol e de andrógenos para excluir SOP como causa de hiperprolactinemia.

As dosagens hormonais mencionadas foram realizadas no Laboratório de Hormônios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.3.3 Avaliação do perfil de PRL sérica: grupo 1

3.3.3.1 Determinação quantitativa da PRL sérica

A PRL sérica foi colhida sempre pela manhã, entre 08:00 e 10:00 horas da manhã, pelo mesmo método imunofluorimétrico (Auto DELFIA Ò Prolactin Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland), com coeficiente de variação intra-ensaio de 1,2 e inter-ensaio de 3,1 e com valor de referência até 14,5 ng/mL.

3.3.3.2 Pesquisa de macroprolactina (bbPRL)

Realizamos a pesquisa de macroprolactina somente naqueles pacientes com PRL sérica acima dos valores de referência. O teste realizado foi a precipitação com polietilenoglicol (PEG) [73-75], método de escolha de rastreamento da macroprolactina, realizado no Laboratório de Hormônios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Uma alíquota de 250 μL de soro de cada paciente foi utilizada para o rastreamento, adicionando-se 250 μL de solução de PEG 6000 (em água, mantido a – 4 ^{0}C). A solução resultante foi homogeneizada por 1 min com vortex e centrifugada (9500 g, por 5 min, em temperatura ambiente). A PRL foi determinada no sobrenadante, por método imunofluorimétrico (DELFIA-

Wallac), e a porcentagem de recuperação foi calculada, sendo a porcentagem < 30% considerada positiva para macroprolactina, acima de 65% excluía macroprolactinemia, e o intervalo entre 30-65%, foi inconclusivo. Neste último caso e também para confirmação dos casos positivos no PEG, foi necessária a realização da cromatografia por gel filtração, considerada padrão ouro para determinação de macroprolactina, e que quantifica as três principais isoformas de PRL (mPRL, bPRL, bbPRL), realizada no laboratório Fleury de São Paulo.

3.3.4 Avaliação do perfil de PRL linfocitária: grupo 2 e controle

3.3.4.1 Extração de células mononucleares

Colhemos uma amostra de sangue venoso periférico de todos os pacientes incluídos no grupo 2 (20 mL/cada) e no grupo controle, para extração de células mononucleares do sangue periférico através do gradiente de Ficoll-Paque (Ficoll-Paque Plus – testado para endotoxinas e utilizado para isolamento de linfócitos – GE Healthcare), conforme técnica já bem estabelecida na literatura [76,77] e instruções de manuseio do próprio produto, otimizada por nós, para posterior colocação dessas células em cultura. Com esta técnica, em geral, obtém-se até 95% de linfócitos, sendo recuperados cerca de 50% dos linfócitos de uma amostra de sangue total.

O sangue foi colhido em tubo plástico com vácuo pré-definido para a aspiração exata do volume, revestido com heparina sódica (vacuette®). Após a coleta, o sangue foi imediatamente diluído na mesma parte (20 mL)

de PBS (solução salina tamponada com fosfato - 1L de PBS: 1L de H_2O autoclavada, 9g de NaCl 0,9%, 20mL de PO_4 0,01M), completando assim, um total de 40 mL de sangue diluído heparinizado. Este volume foi distribuído em tubo estéril com fundo cônico de polipropileno de 15 mL (tipo Falcon), com a seguinte disposição em cada tubo: 3 mL de Ficoll-Paque®, em seguida 5 mL de sangue diluído heparinizado, colocado lentamente, SEM MISTURAR, totalizando 8 mL em cada tubo, sendo 8 tubos para cada paciente (Figura 6):

Figura 6: Ilustração do preparo: sangue diluído com Ficoll-Paque® (sem misturar)

Após o preparo dos tubos, foi realizada a primeira centrifugação nas seguintes condições: 1600 rotações por minuto (rpm), na centrífuga 5804R, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Após o término do tempo, os tubos foram retirados da centrífuga e já se visualizava uma nítida “nuvem” de linfócitos, de fácil separação com pipeta *Pasteur* (Figura 7).

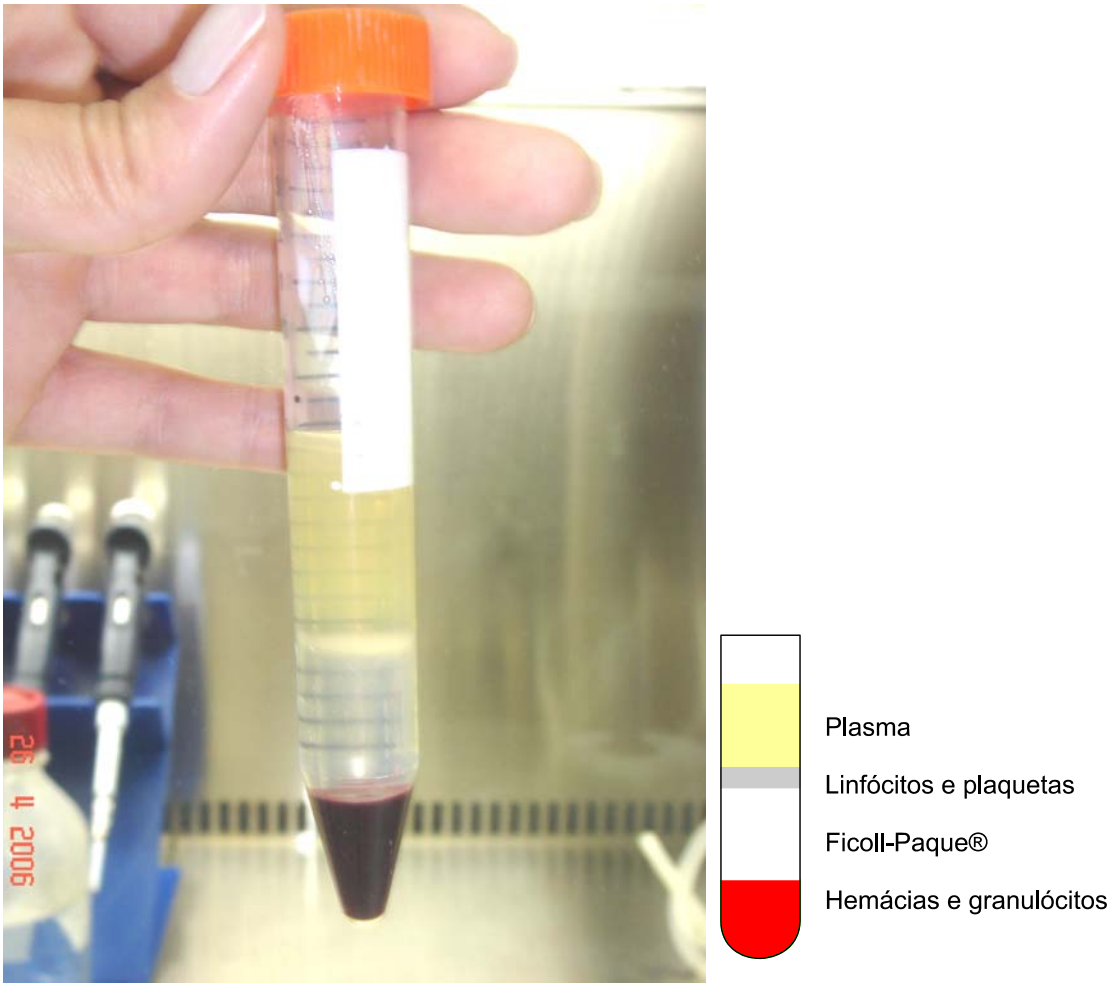

Figura 7: Ilustração da separação dos componentes do sangue

Após separação por fases dos componentes do sangue, foi retirada a "nuvem" de linfócitos com pipeta *Pasteur* e transferida para um novo tubo de 15 mL, desta vez com 5 mL de PBS e então foi realizada a segunda centrifugação (remover o excesso de Ficoll-Paque®, plaquetas e proteínas plasmáticas que eventualmente estivesse na nuvem de linfócitos). Essa centrifugação foi realizada com 1500 rpm, em temperatura ambiente, por apenas 5 minutos, como se usa rotineiramente para separar os mais variados tipos celulares em cultura.

Após esta centrifugação, o *pellet* foi facilmente visualizado, o sobrenadante foi desprezado com re-suspensão do *pellet* novamente em PBS e repetido o mesmo procedimento de centrifugação, para lavar qualquer excesso de Ficoll-Paque® e plaquetas. Este passo foi repetido de uma a três vezes, o necessário para isolar os linfócitos.

Em seguida, os linfócitos foram re-suspensos em meio de cultura apropriado, sem soro (livre de hormônios lactogênicos), denominado AIM V (Gibco™ AIM V Medium liquid : **contém** AlbuMAX (albumina sérica bovina), L-glutamina, sulfato de estreptomicina 50 g/ml, e sulfato de gentamicina 10 g/ml), na concentração de 2,0 x 10^6 células/mL (viabilidade avaliada pelo azul de Tripan), em garrafas estéreis, próprias para cultura celular, de 25 cm^3 e acondicionadas em incubadoras, numa atmosfera com 5% CO_2 e 95% de O_2, a 37^0 C (Figura 8).

As células permaneceram em cultura por 72 horas (Figura 9), e ao final deste período, as culturas foram finalizadas. Foi realizada centrifugação com 1500 rpm, em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi colhido e congelado a - 80^0 C , a fim de evitar a degradação da PRL linfocitária, contida no sobrenadante, até o momento da utilização dos mesmos nos bioensaios.

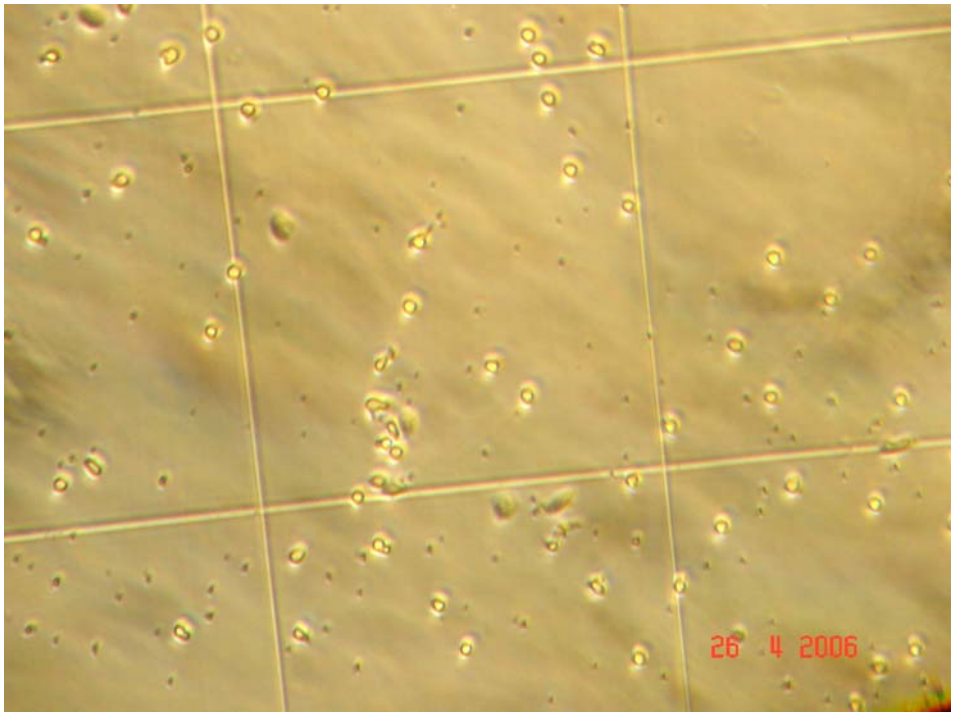

Figura 8: Ilustração dos linfócitos em câmara de Neubauer (aumento de 100x)

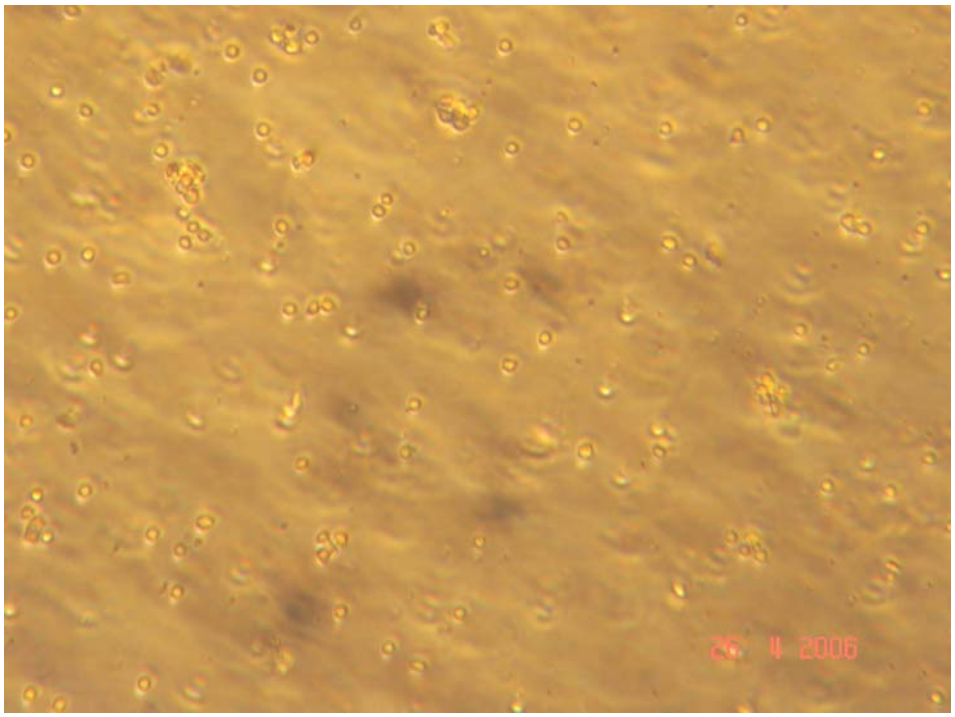

Figura 9: Ilustração dos linfócitos em cultura (aumento de 100x)

Os *pellets* foram imediatamente submetidos à extração do RNA total.

3.3.4.2 Bioensaios

3.3.4.2.1 Células Nb2

Tanaka e colaboradores [78] descreveram um ensaio extremamente sensível e específico para hormônios lactogênicos, em 1980, denominado "Nb2", atualmente muito difundido na literatura, sendo o mais utilizado para avaliar bioatividade da PRL, seja esta, humana ou não, e das suas isoformas. Este ensaio utiliza células Nb2, que são células pré-T, derivadas de linfoma transplantável de rato masculino estrogenizado, da linhagem *Noble* (Nb), que proliferam quase que exclusivamente na presença de hormônios lactogênicos, como GH e PRL, mesmo em baixas concentrações. Neste ensaio a bioatividade é medida pela proliferação celular, que ocorre com máxima intensidade em torno de 1 ng/mL de PRL [8,69,78].

Estas células apresentam alta densidade de PRLR, cerca de 12.000 receptores por célula, característica que colabora para alta sensibilidade do ensaio. Os PRLRs são do tipo murino e de tamanho intermediário, com deleção de 594 pares de bases e perda de 198 aminoácidos da proteína madura quando comparado a isoforma longa nativa. Apesar disso, a sinalização intracelular é mantida, e este receptor possui maior afinidade, cerca de 3 a 4 vezes mais, que a isoforma longa nativa [79].

Estas células foram cedidas pelo Prof. Paolo Bartolini, pesquisador do IPEN. As células foram cultivadas em suspensão, no meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro de cavalo castrado (SC), 10% de soro fetal

bovino (SFB), 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 0,1 mM de β-mercaptoetanol, mantendo uma capacidade de dobrar o número de células a cada 12 horas.

No bioensaio proposto por Tanaka e colaboradores [78], estas células devem ser mantidas em meio com 1% de SFB e 10% de SC, por 24 horas antes da realização do ensaio, fase chamada de pré-ensaio, para diminuir sua capacidade de replicação, tornando-se desta forma, mais sensível quando for colocada em meio com hormônio lactogênico.

Uma solução conhecida de PRL humana recombinante (rPRL), lote 97/714, da Organização Mundial de Saúde (OMS), foi sempre utilizada nos ensaios, para construção de uma curva padrão, em concentrações decrescentes, sendo 1 ng/mL a concentração máxima (concentrações utilizadas: 1,0/0,5/0,25/0,125/0,062/0,031/0,015/0,008 ng/mL), diluída no meio AIM V. Foram utilizados 150 µL de cada amostra (sobrenadante da cultura de linfócitos). As amostras foram comparadas a esta curva padrão de rPRL.

Foi utilizado o próprio meio AIM V para diluição da rPRL padrão ao invés do meio RPMI, como padronizado no IPEN, para otimizar a sensibilidade deste ensaio e evitar viés de interpretação pela utilização de meios distintos (RPMI para construção da curva padrão com PRL e AIMV, onde as amostras de PRL linfócitária estão contidas). O meio RPMI incolor foi utilizado apenas para diluição das células Nb2. Com esta nova

padronização, a sensibilidade deste ensaio foi semelhante ao do realizado com RPMI e não foi necessária a fase de pré-ensaio (Figura 10).

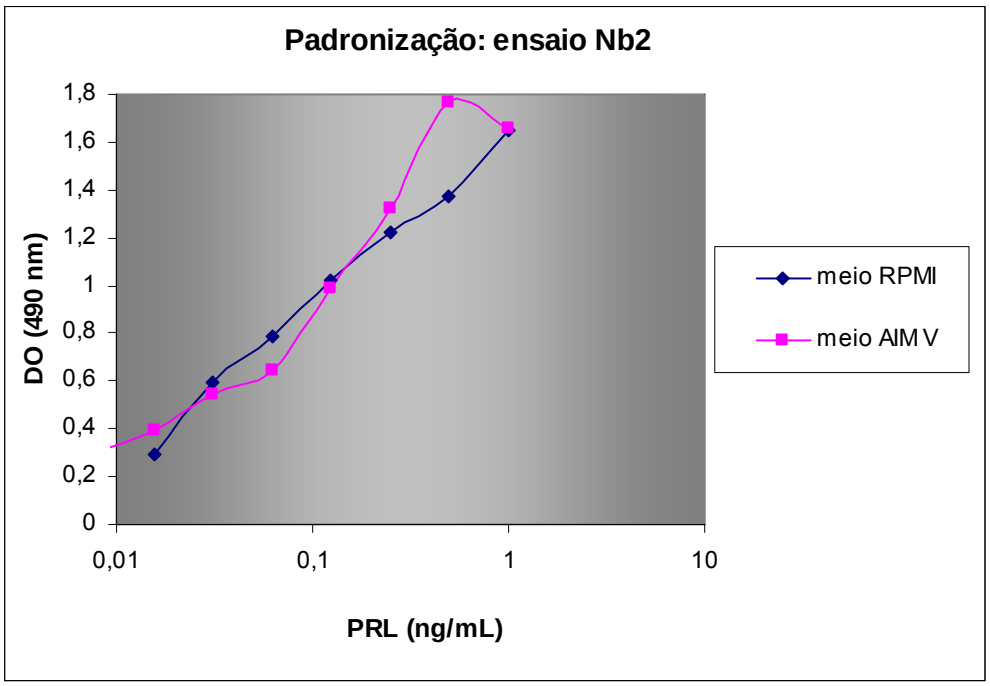

Figura 10: Padronização do bioensaio Nb2: meio RPMI *vs* AIM V

Após a preparação da placa com 96 poços, contendo as diluições conhecidas da rPRL e as amostras de PRL linfocitária, as células Nb2 foram distribuídas, numa concentração celular de 2,5 x 10^4 células por poço (diluídas em 50 μL de meio RPMI incolor), perfazendo um volume final de 200 μL. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Após preparação dos ensaios, as células foram incubadas a 37^0 C, 5% CO_2 por 72 hs. As resposta dos ensaios foram medida através da densidade óptica (DO), proporcional à proliferação celular, utilizando a

reação com MTS. O MTS [3(4,5-dimetilltiazol-2-yl)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolina] (Promega Corp., Madison, WI, EUA) a 2 mg/mL foi diluído em PBS e adicionado à fenazina metosulfato, PMS (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 0,92 mg/mL, em uma proporção de 20:1 (vol/vol). Foram adicionados 20 µL desta mistura a cada poço das placas de ensaio e após 2 horas a 37^0 C, realizou-se a leitura da DO à absorbância de 490 nm em leitor automatizado (Dynatech, model MR4000, Chantilly, VA, EUA).

Na fase de padronização, também foi realizado um ensaio de acordo com o descrito acima, utilizando duas amostras de indivíduos normais, em meio sem e com adição de anticorpo anti-PRL (anticorpo de coelho anti-PRL humana NIDDK-anti-hPRL-3, AFP-C11580) na diluição final de 1:4000. As amostras obtiveram bioatividades semelhantes, que foram prontamente inibidas na presença deste anticorpo, comprovando a existência da PRL no sobrenadante das amostras (Figura 11).

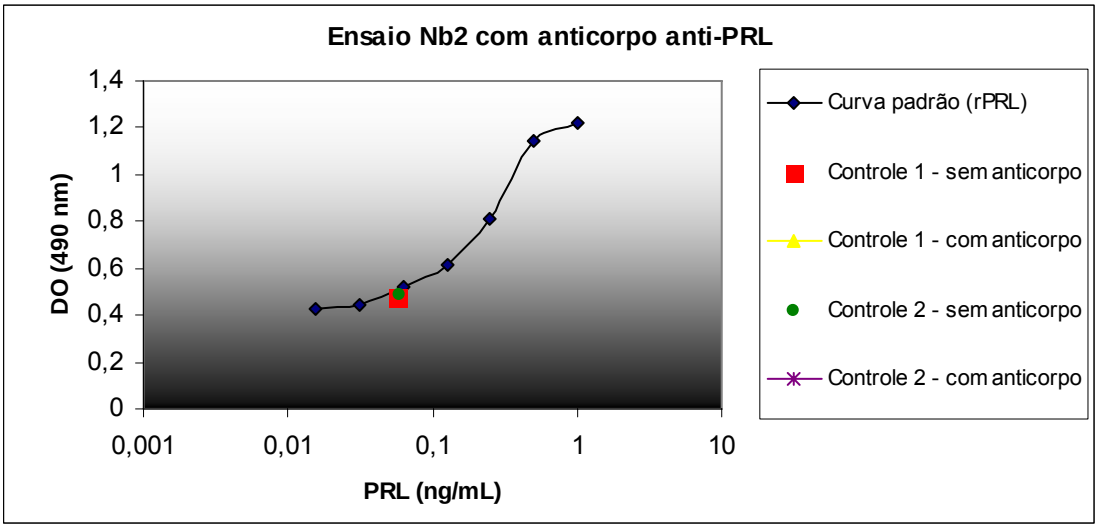

Figura 11: Bioensaio Nb2 com anticorpo anti-PRL: comprovação da presença de PRL no sobrenadante da cultura de linfócitos

Após estas padronizações, todas as amostras foram testadas e comparadas à curva padrão com uso de rPRL.

Para cada ensaio foi realizada uma curva padrão. O nível de PRL linfocitária foi calculado manualmente em papel milimetrado com escala logarítmica, de acordo com a curva padrão de rPRL e com os valores de DO das amostras de cada ensaio, obtendo-se assim a sua detecção indireta, que pode ser observada na ordem de picogramas (pg/mL).

3.3.4.2.2 Células Ba/F-LLP

São derivadas de uma população de células murinas pró-B, dependentes de IL-3, que foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da isoforma longa do receptor de PRL humano (hPRLR), com sensibilidade maior à PRL do que suas células precursoras. O crescimento máximo acontece com a concentração de 1 ng/mL, no entanto, são menos sensíveis aos hormônios lactogênicos do que as células Nb2. Porém, este é um ensaio homólogo: PRLR dessas células é humano, sendo mais específico [8,80].

Estas células foram mantidas em suspensão no meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB; 2 mM de glutamina; 50 U/mL de penicilina; 50 µg/mL de estreptomicina; 700 µg/mL of geneticina e 1 ng/mL de rPRL. No dia do ensaio, as células foram centrifugadas e re-suspensas em meio semelhante, porém com 1% de SFB, por 4 horas, sem adição de PRL, etapa chamada de pré-ensaio, que aumenta a sensibilidade destas células ao estímulo da PRL.

A partir deste passo, todos os outros são exatamente iguais (construção de curva padrão com rPRL, uso de meio AIM V, concentração celular) aos descritos no bioensaio Nb2.

O ensaio Ba/F-LLP com meio AIM V precisou da fase de pré-ensaio para manter sensibilidade semelhante ao ensaio já bem padronizado no IPEN, que utiliza o meio RPMI (Figura 12).

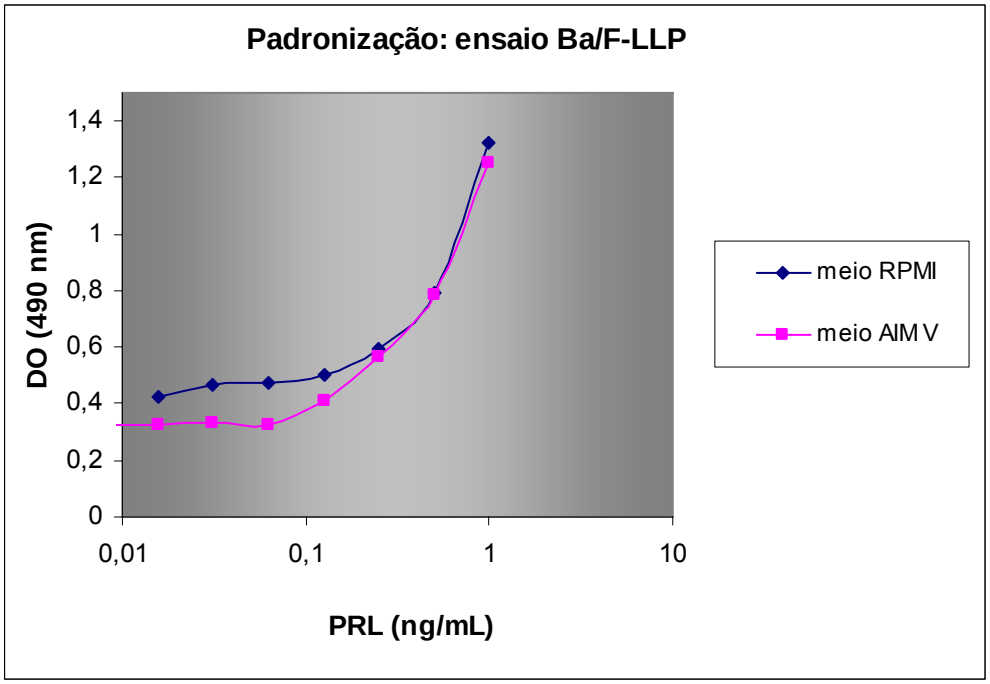

Figura 12: Padronização do bioensaio Ba/F-LLP: meio RPMI *vs* AIM V

3.3.4.3 Extração do RNA total

Os RNAs totais foram extraídos imediatamente a partir do *pellet* de células (linfócitos) após 72 horas de cultura (nas condições acima descritas). Foi utilizado o reagente de TRIzol® (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA)

conforme recomendação descrita no produto comercial e protocolo de extração já bem estabelecido na literatura [81]:

- Foi adicionado 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) ao *pellet*, obtido após a centrifugação da cultura de linfócitos e a retirada do sobrenadante (usado nos bioensaios), até desfazer o *pellet*;
- Logo em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio agitando-se vigorosamente por 15 segundos e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente;
- A centrifugação foi feita por 20 minutos a 12.000 x g a 4^0C (centrífuga 5804R);
- O sobrenadante (contendo o RNA total) foi transferido para um outro tubo estéril de polipropileno de 1,5 mL, livre de DNAases e RNAases, e os RNAs precipitados com adição de 1000 µL de isopropanol;
- A mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos, na temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4°C;
- O sobrenadantes foi desprezado por inversão e o *pellet* de RNA lavado com 1000 µL de etanol à 75%;
- Nova centrifugação foi feita, desta vez a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi mais uma vez desprezado, e o *pellet,* completamente seco, era re-suspenso em 50 µL de água estéril tratada previamente com dietilpirocarbonato de sódio (DEPC) (Sigma) na concentração final de 0,1%;

- As amostras (após avaliação da integridade e quantificação – descritas a seguir) eram acondicionadas em freezer a - 80 °C, até sua utilização no PCR em tempo real, para evitar degradação do RNA.

3.3.4.4 Análise da integridade do RNA total

A integridade dos RNAs totais foram avaliadas por eletroforose em gel de agarose a 1% com desnaturação. Amostras de 10 µg de RNA foram re-dissolvidas em tampão MOPS/ formaldeído contendo 50% de formamida, 5% de azul de bromofenol e 5 mg/mL de brometo de etídeo, à eletroforese a 109 volts por 30-40 min. Foram utilizadas somente as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal (RNAr) 18S e 28S mostraram-se íntegras à analise sob luz ultravioleta, como no exemplo abaixo (Figura 13):

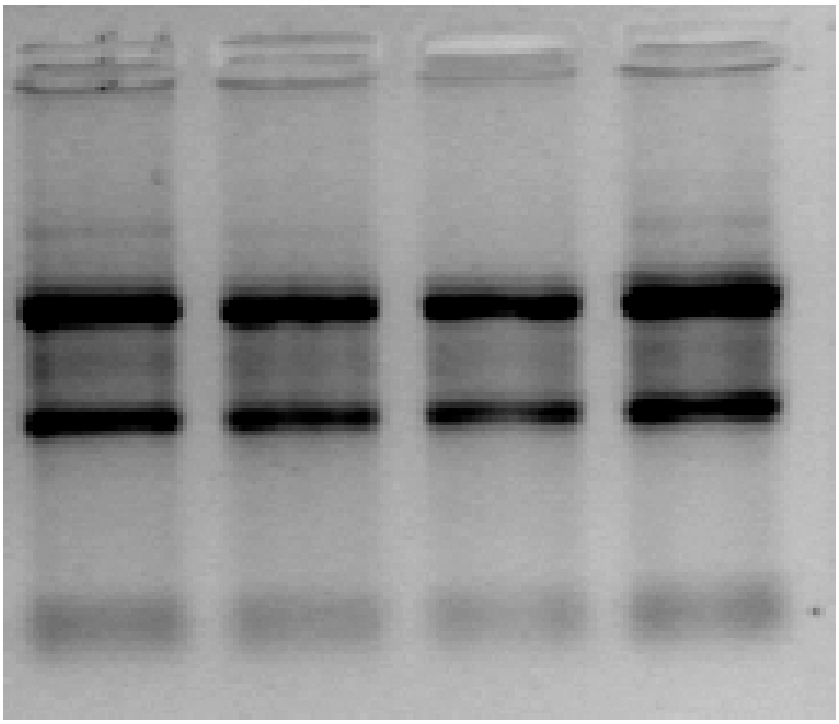

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose: integridade do RNA (exemplo de 4 amostras)

3.3.4.5 Quantificação do RNA

As concentrações dos RNAs totais extraídos foram determinadas por espectrofotometria [GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)]. A estimativa da quantidade de RNAs foram realizadas medindo-se a absorbância 260 nm e 280 nm, sendo a primeira leitura correspondente à quantidade de ácidos nucléicos (DNA e RNA) na amostra e a segunda a concentração protéica. A preparação dos RNAs foram consideradas livres de proteínas quando a relação $A_{260/280}$ encontravam-se entre 1,8 e 2,0. Somente amostras com relação $A_{260/\ 280}$ entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas [82].

3.3.4.6 RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

Esta etapa foi realizada para avaliação da expressão do gene *PRL* nos linfócitos de forma quantitativa.

A RT-PCR em tempo real ou RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) foi realizada num termociclador fluorométrico (ABI Prism 7000 Sequence Detection System), sendo a fluorescência monitorada durante todos os ciclos da RT-PCR, na fase de anelamento, utilizando-se o método *one step* [83] através do kit comercialmente disponível SuperScript^{tm}III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). No mesmo experimento, a partir do RNA total, temos a formação, através da transcriptase reversa, de DNA complementar (c-DNA) e a partir deste, a reação em cadeia de polimerase (PCR) [84,85].

A reação de transformação do RNA em c-DNA, através da enzima transcriptase reversa, ocorreu a 50°C, por 5 minutos, em seguida da incubação a 95°C por mais 5 minutos.

Após este período, a enzima transcriptase reversa foi destruída, seguida pela ativação da DNA polimerase. As reações foram realizadas em 25 μL de volume total com 150 ηg de RNA; 0,5 ηM *primer sense* e *anti-sense* do gene *GAPDH*, utilizado como controle interno (endógeno) ou do gene *PRL,* alvo (em estudo); 2x Syber® Green Reaction mix e ROX reference Dye 500nM.

A quantificação relativa do gene *PRL* foi realizada utilizando-se como calibrador um *pool* do grupo controle (10 indivíduos normais). Por ser uma quantificação relativa, as amostras foram calculadas automaticamente pelo número de vezes da expressão (mais ou menos) em relação ao calibrador, que foi considerado sendo um (1), arbitrariamente.

Foram realizados 40 ciclos em cada ensaio, ocorrendo cada ciclo da seguinte forma: 20 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (extensão).

Todas as reações foram realizadas em triplicata, sendo os dois genes sempre testados para cada amostra num mesmo ensaio, evitando possíveis diferenças entre os ensaios. Em todas as reações foi utilizado o *pool* de normais e um controle negativo (ausência de RNA).

Os oligonucleotídeos seqüência-específicos utilizados na amplificação dos genes validados foram obtidos a partir do programa Primer 3 [86]:

(http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) (Tabela 4):

Tabela 4: Desenho dos *primers* exônicos (PRL e GAPDH)

	Sense	***Anti-sense***
PRL	5' GAAGTGTGTTTCCTGCAACG 3'	5' GGTCAAACAGGTCTCGAAGG 3'
GAPDH	5' CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT 3'	5' TGAGGTCAATGAAGGGGTCA 3'

3.3.4.7 Integridade do produto qRT-PCR e Sequenciamento do material

A integridade dos produtos de qRT-PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, para certificarmos a ausência de produtos inespecíficos e dímeros de *primer,* e confirmar o produto através do tamanho molecular [87] (Figura 14).

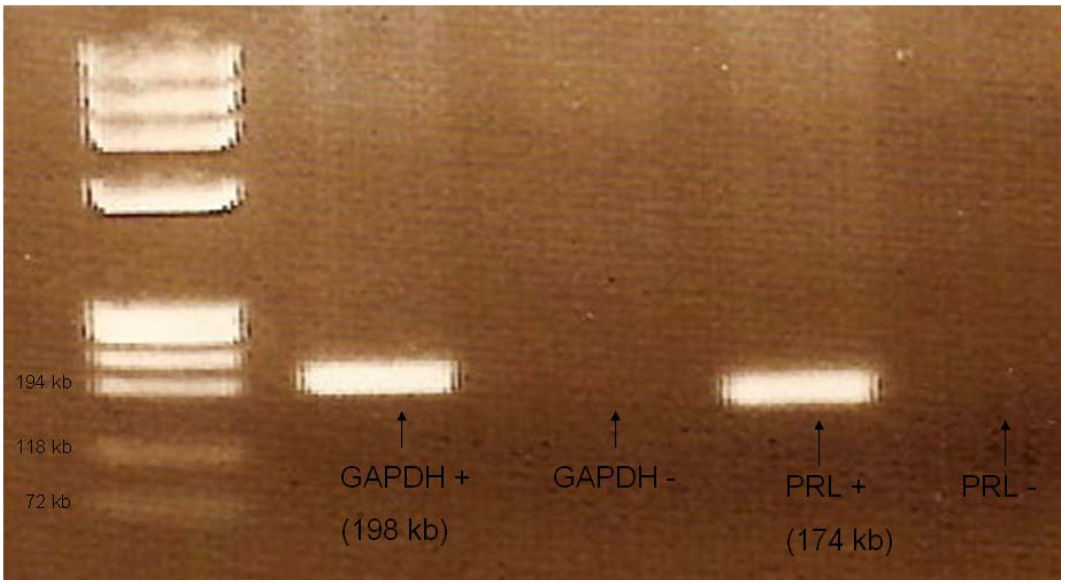

Figura 14: Produtos de RT-PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%: análise dos fragmentos amplificados dos genes *GAPDH e PRL* (marcador de peso molecular: ΦX 174/HAE III)

Os genes amplificados, *GAPDH* e *PRL,* foram seqüenciados.

3.3.4.8 Método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de *threshold cycle* (CT) ou limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de qRT-PCR começa a ser detectada [88,89].

O cálculo da quantificação, para permitir uma comparação expressa em número de vezes, foi descrito por Livak[90]: método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra é o ΔCT. $\Delta\Delta$CT corresponde à diferença entre o ΔCT de uma determinada amostra e o ΔCT do calibrador.

Foi necessária a determinação inicial da eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno, para validar o uso do método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para isso, foi realizada uma curva para cada um dos genes estudados, com diluições progressivas 1:2 de amostras de RNA total, com o objetivo de observar uma diferença entre as diluições de um ciclo (CT). Todas as diluições seriadas foram amplificadas por qRT-PCR (Figura 15). A curva padrão foi realizada com o gene alvo (*PRL*) e endógeno (*GAPDH*).

Cada ponto da reta foi estabelecido pela relação do logaritmo da quantidade do RNA total da amostra no eixo das abscissas e o CT da amostra no eixo das ordenadas. A validação do experimento é obtida por uma equação da reta em que a inclinação da mesma seja o mais próximo de -3,3, com relação r ≥0,99 (Figura 16). Como tivemos uma eficiência de amplificação comparável, com inclinação da reta (*slope*) < 0,1 (Figura 17), foi utilizado este método.

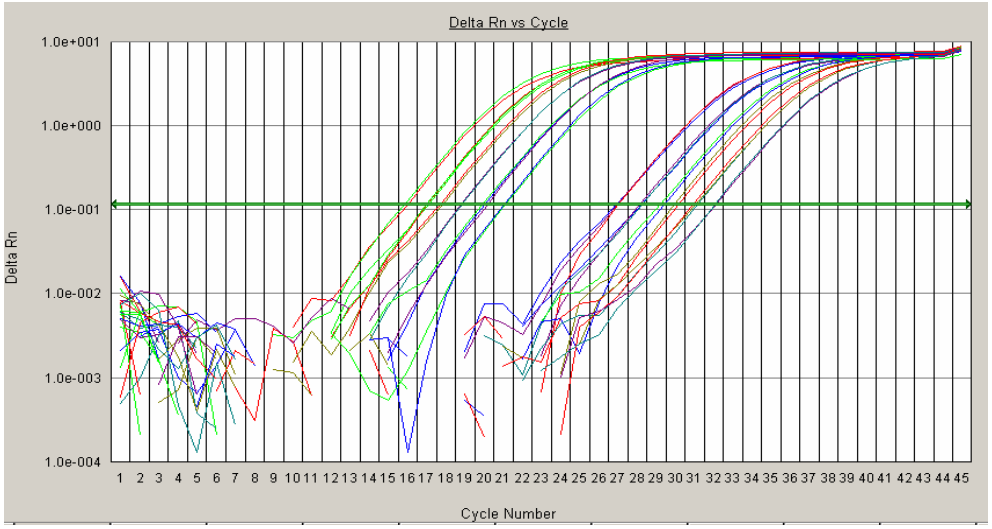

Figura 15: Amplificação dos genes *GAPDH* e *PRL*, respectivamente, com diluições sucessivas de uma amostra de RNA total (grupo controle)

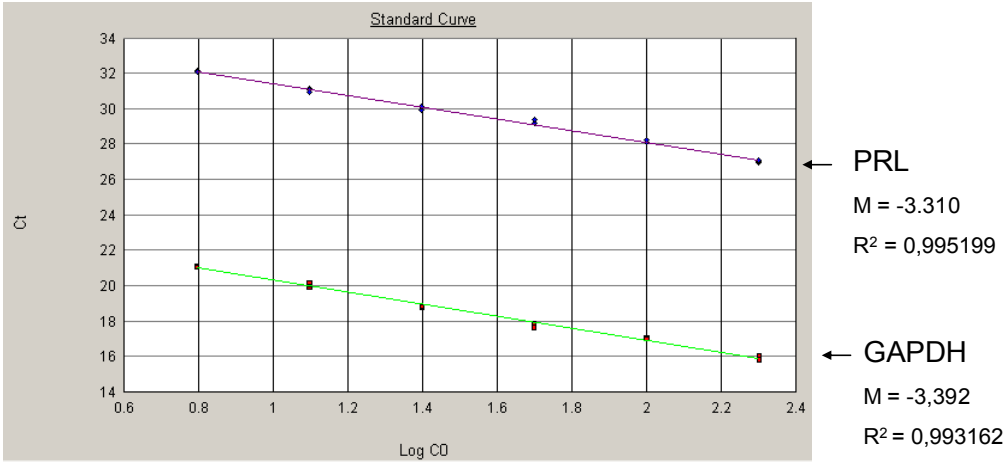

Figura 16: Curva padrão para os genes (*GAPDH e PRL*)

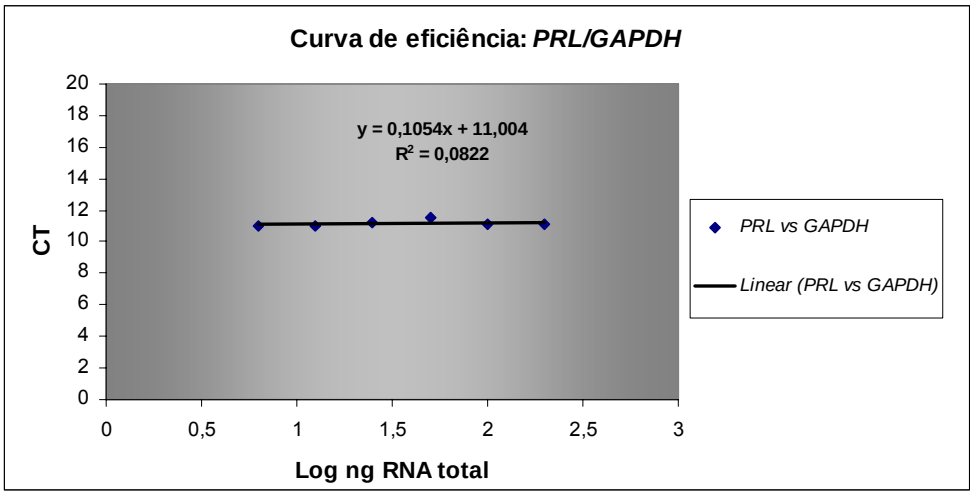

Figura 17: Curva de eficiência: genes *GAPDH e PRL* (*slope* < 1)

3.4 Análise estatística

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, a análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e dos cálculos das medianas, médias e desvios-padrões (DP). Para as variáveis qualitativas, calculamos-se as seqüências absolutas e relativas.

Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Na comparação de três grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para o estudo da correlação entre duas variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5% ($p < 0,05$) [91].

4. Resultados

4.1 Grupo 1: avaliação da PRL sérica

Descrevemos nas tabelas 5a e 5b, os dados laboratoriais sobre o perfil da PRL sérica, da pesquisa de macroprolactinemia e consequentemente da mPRL no grupo 1 (total de 73 pacientes): 1A (LES ativo com 28 pacientes) e 1B (LES inativo com 45 pacientes). No final de cada tabela estão especificados: médias com DPs e as medianas da PRL sérica e da mPRL; porcentagem de hiperprolactinemia sérica e monomérica; e prevalência de macroprolactinemia no total de pacientes e somente nos hiperprolactinêmicos. Na tabela 6, fizemos um melhor detalhamento apenas dos pacientes hiperprolactêmicos deste grupo.

Tabela 5a: Perfil de PRL do grupo 1A (LES Ativo)

Paciente	PRL sérica (VR: até 14,5 ng/mL)	Pesquisa de bbPRL (PEG)	Pesquisa de bbPRL (cromatografia)	mPRL (VR: até 14,5 ng/mL)
1	38,9	Negativa	—	38,9
2	23,2	Negativa	—	23,2
3	9,2	—	—	9,2
4	12,3	—	—	12,3
5	26,3	Inconclusiva	Negativa	26,3
6	10,4	—	—	10,4
7	20,5	Negativa	—	20,5
8	23,1	Negativa	—	23,1
9	16,2	Inconclusiva	Negativa	16,2
10	5,2	—	—	5,2
11	7,1	—	—	7,1
12	7,7	—	—	7,7
13	9,5	—	—	9,5
14	5	—	—	5
15	11,3	—	—	11,3
16	10,2	—	—	10,2
17	15,4	Inconclusiva	Negativa	15,4
18	7,7	—	—	7,7
19	5,6	—	—	5,6
20	5,7	—	—	5,7
21	11,6	—	—	11,6
22	11,3	—	—	11,3
23	10,3	—	—	10,3
24	14	—	—	14
25	11,5	—	—	11,5
26	5,6	—	—	5,6
27	13,6	—	—	13,6
28	4,9	—	—	4,9
Total	**12,6 ± 7,7 10,8 (4,9 – 38,9) 7/28 (25%)**	**∅ positiva Ausência de macroprolactinemia**	**∅ positiva Ausência de macroprolactinemia**	**12,6 ± 7,7 10,8 (4,9 – 38,9) 7/28 (25%)**

Tabela 5b: Perfil de PRL do grupo 1B: LES Inativo

Paciente	PRL sérica (VR: até 14,5 ng/mL)	Pesquisa de bbPRL (PEG)	Pesquisa de bbPRL (cromatografia)	mPRL
1	4,7	—	—	4,7
2	15,5	Positiva (22%)	Positiva	3,41
3	5,9	—	—	5,9
4	9,8	—	—	9,8
5	7,2	—	—	7,2
6	11,6	—	—	11,6
7	12,3	—	—	12,3
8	8,1	—	—	8,1
9	7	—	—	7
10	1,9	—	—	1,9
11	9	—	—	9
12	5,4	—	—	5,4
13	6,1	—	—	6,1
14	7,3	—	—	7,3
15	6,4	—	—	6,4
16	2,2	—	—	2,2
17	3,3	—	—	3,3
18	3,8	—	—	3,8
19	6,9	—	—	6,9
20	11,5	—	—	11,5
21	6,9	—	—	6,9
22	6,5	—	—	6,5
23	17,4	Inconclusiva	Negativa	17,4
24	7,1	—	—	7,1
25	6,1	—	—	6,1
26	3,7	—	—	3,7
27	10,4	—	—	10,4
28	16,5	Negativa	—	16,5
29	15,8	Negativa	—	15,8
30	7,4	—	—	7,4
31	15,9	Inconclusiva	Negativa	15,9
32	49,6	Positiva (9%)	Positiva	4,4
33	7,2	—	—	7,2
34	8	—	—	8
35	6,8	—	—	6,8
36	16,1	Negativa	—	16,1
37	12,8	—	—	12,8
38	32,7	Positiva (9%)	Positiva	2,8
39	8,2	—	—	8,2
40	7,6	—	—	7,6
41	13,6	—	—	13,6
42	20,6	Negativo	—	20,6
43	5,2	—	—	5,2
44	13,1	—	—	13,1
45	8	—	—	8
Total	**10,4 ± 8,1** **7,6 (1,9 – 49,6)** **9/45 (20%)**	**3 positivas** **3/45 (6%)** **3/9 (33%)**	**3 positivas** **3/45 (6%)** **3/9 (33%)**	**8,4 ± 4,4** **7,2 (1,9 -20,6)** **6/45 (13,3%)**

Tabela 6: Perfil dos hiperprolactinêmicos: grupo 1

Paciente	**PRL sérica**	**Presença de bbPRL (confirmada)**	**mPRL**
LES Ativo 1	38,9	Negativa	38,9
LES Ativo 2	23,2	Negativa	23,2
LES Ativo 5	26,3	Negativa	26,3
LES Ativo 7	20,5	Negativa	20,5
LES Ativo 8	23,1	Negativa	23,1
LES Ativo 9	16,2	Negativa	16,2
LES Ativo 17	15,4	Negativa	15,4
LES Inativo 2	15,5	Positiva (22%)	3,4
LES Inativo 23	17,4	Negativa	17,4
LES Inativo 28	16,5	Negativa	16,5
LES Inativo 29	15,8	Negativa	15,8
LES Inativo 31	15,9	Negativa	15,9
LES Inativo 32	49,6	Positiva (9%)	4,4
LES Inativo 36	16,1	Negativa	16,1
LES Inativo 38	32,7	Positiva (9%)	2,8
LES Inativo 42	20,6	Negativa	20,6
Total	22,7 ± 9,8 18,9 16/73 (21,9%)	3 positivas 3/16 (18,7 %)	17,2 ± 9,0 16,3 13/73 (17,8%)

LES Ativo:
PRL sérica: 23,1 (15,4 – 38,9) ng/mL
mPRL: 23,1 (15,4 – 38,9) ng/mL
LES Inativo:
PRL sérica: 16,5 (15,5 – 49,6) ng/mL
mPRL: 15,9 (2,8 – 20,6) ng/mL

A partir destes dados, podemos observar que a PRL sérica está discretamente elevada em 16 de 73 pacientes do grupo 1 (LES ativo e inativo), perfazendo 21,9% dos casos, sendo 7 de 28 pacientes (25%) com LES em atividade e 9 de 45 pacientes (20%) em inatividade. Esses achados estão de acordo com literatura [45-51].

A PRL sérica dos pacientes do grupo 1A (LES ativo) teve uma mediana de 10,9 (4,9 – 38,9) ng/mL. Já a PRL sérica do grupo 1B (LES inativo) teve uma mediana de 7,6 (1,9 – 49,6) ng/mL, portanto, sem diferença significante entre os dois grupos (p=0,123), quanto ao nível de PRL sérica (Figura 18).

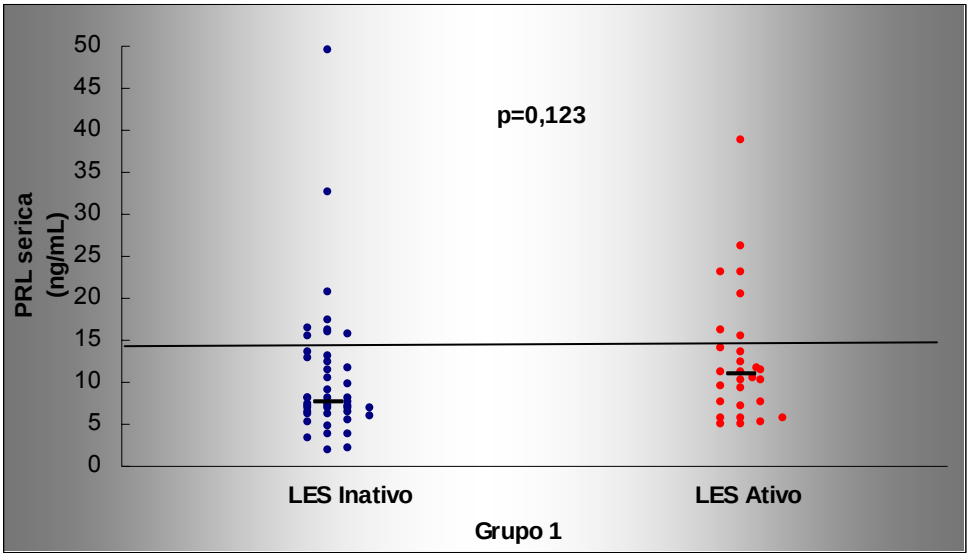

Figura 18: Grupo 1: Comparação do nível de PRL sérica entre pacientes com LES ativo (1A) e inativo(1B) – teste de Mann-Whitney (p=0,123)

No entanto, se considerarmos apenas o nível sérico da mPRL, dosada após precipitação com PEG e confirmada pela cromatografia por gel-filtração, a mediana do grupo 1B (LES inativo) caí para 7,3 ng/mL (1,9 – 20,6 ng/mL), devido à presença de macroprolactinemia, comprovada em três pacientes deste subgrupo. Desta forma, quando comparado ao grupo 1A (LES ativo), o grupo 1B apresenta uma mediana de mPRL significantemente menor (p=0,016) (Figura 19).

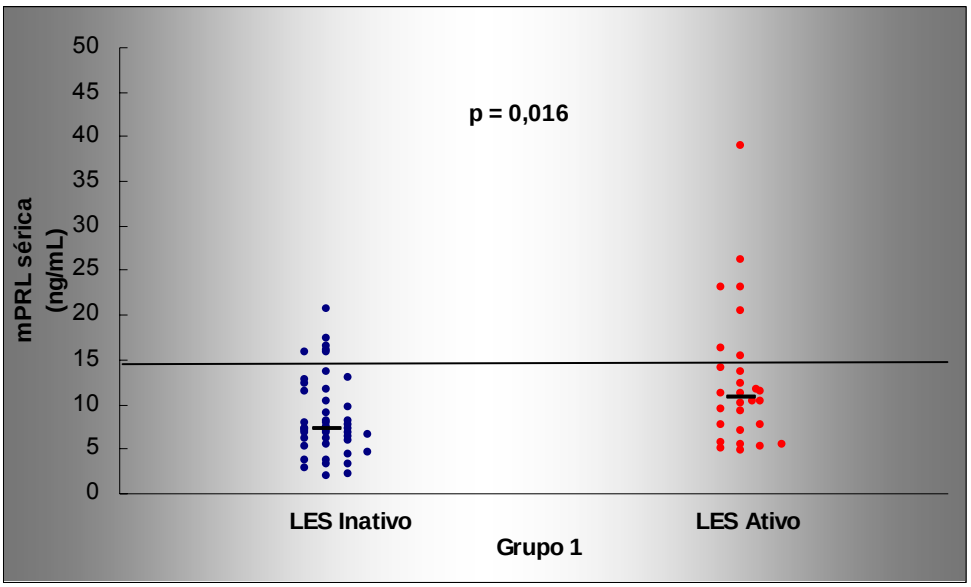

Figura 19: Grupo 1: Comparação do nível de mPRL sérica entre pacientes com LES ativo (1A) e inativo(1B) – teste de Mann-Whitney (p=0,016)

No grupo 1A, correlacionamos os valores de PRL sérica com os de SLEDAI. Nenhuma correlação significante foi encontrada (Figura 20).

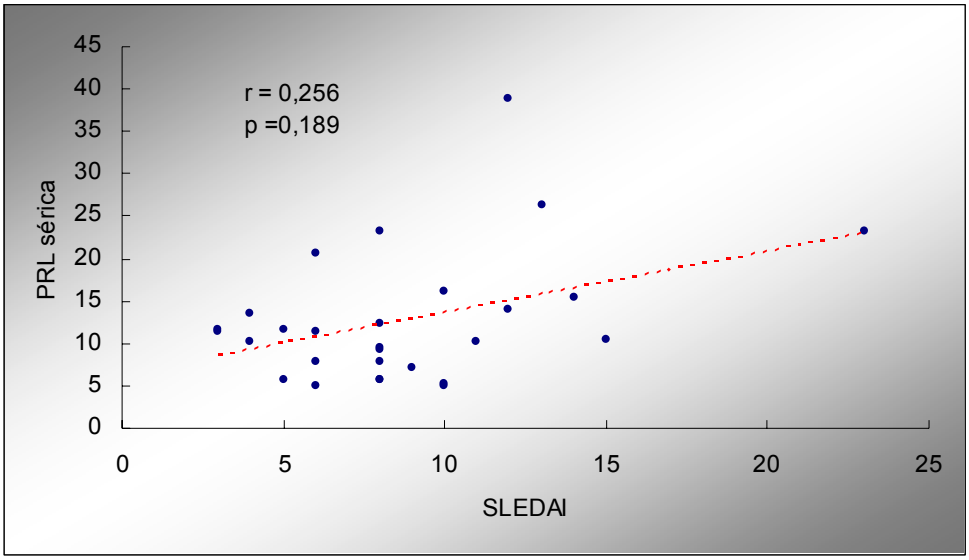

Figura 20: Correlação: PRL sérica *vs* SLEDAI – análise de Spearman (p=0,189)

4.2 Grupo 2: avaliação da PRL linfocitária

4.2.1 Bioensaios (grupo 2 e controle)

Como já explicado anteriormente, somente o grupo 2 (um subgrupo do grupo 1), que totalizou 30 pacientes: 18 pacientes com LES em atividade (grupo 2A) e 12 com LES em inatividade (grupo 2B) foram avaliados nesta fase, juntamente com o controle de normais. São eles: LES Ativo: 1 ao 18 e LES Inativo: 1 ao 12, descritos nas tabelas 3a e 3b (Anexo 3).

4.2.1.1 Células Nb2

Obtivemos níveis baixos de bioatividade e/ou produção da PRL linfocitária quando comparados à curva padrão de rPRL. Mesmo sendo um ensaio extremamente sensível para detecção de mínimas quantidades de PRL, para avaliação da sua bioatividade, não encontramos diferença com significância estatística dos níveis de PRL linfocitária entre os grupos 2A, 2B e controle. Foram necessários dois ensaios definitivos para determinação de todas as amostras, sempre nas mesmas condições descritas nos métodos.

O ensaio 1 avaliou as seguintes amostras: grupo controle: 3,6,9; grupo 2A (LES ativo): 1,4,7,9 e 11; grupo 2B (LES inativo): 3,6,8 e 12. O ensaio 2 avaliou o restante das amostras: grupo controle: 1,2,4,5,7,8 e 10; grupo 2A (LES ativo): 2,3,5,6,8,10, 12 ao 18 ; grupo 2B (LES inativo): 1,2,4,5,7,9,10 e 11. As figuras 21,22,23,24,25 e 26 mostram os resultados dos ensaios, separados pelos respectivos grupos. A comparação das medianas de PRL linfocitária está apresentada na figura 27.

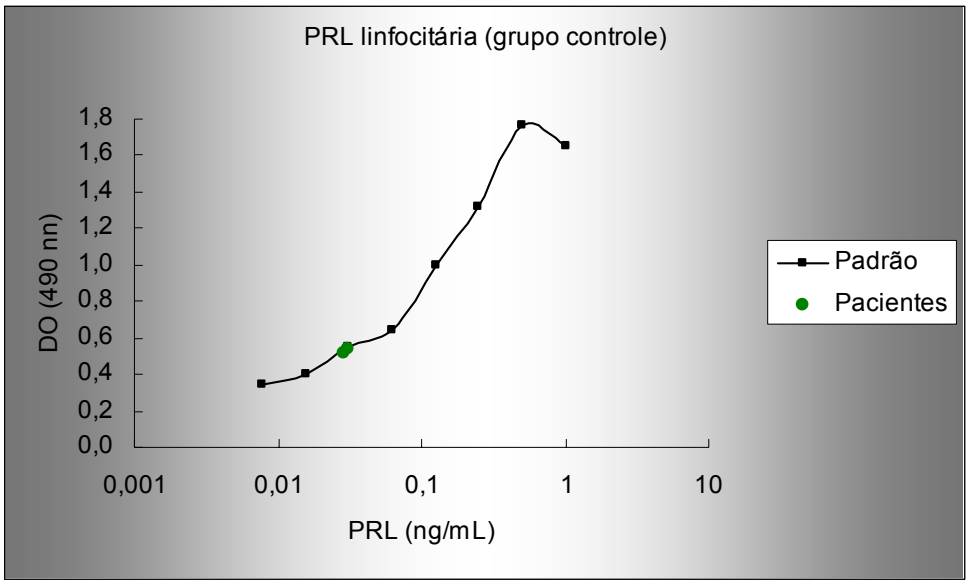

Figura 21: Ensaio 1 (Nb2): amostras (3,6 e 9) do grupo controle

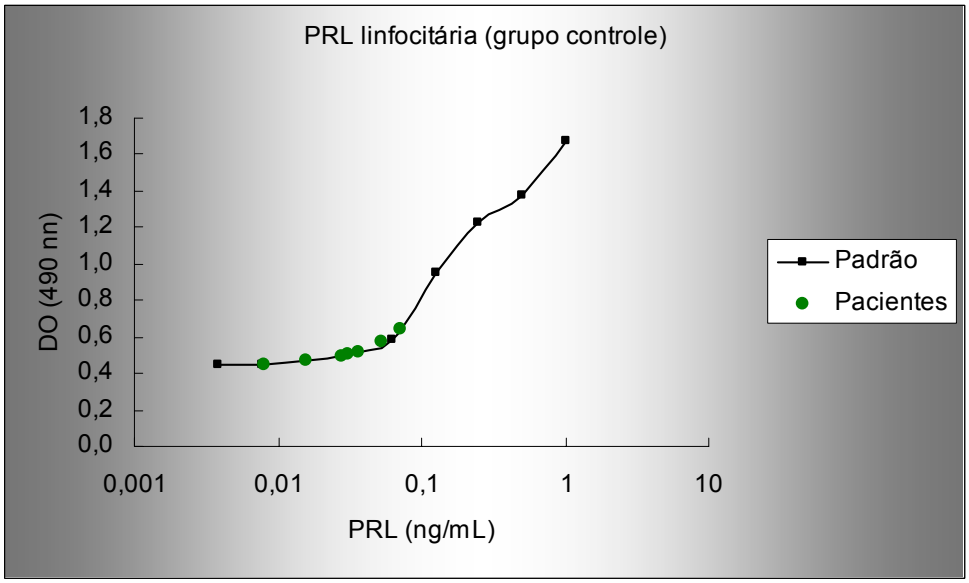

Figura 22: Ensaio 2 (Nb2): amostras (1,2,4,5,7,8 e 10) do grupo controle

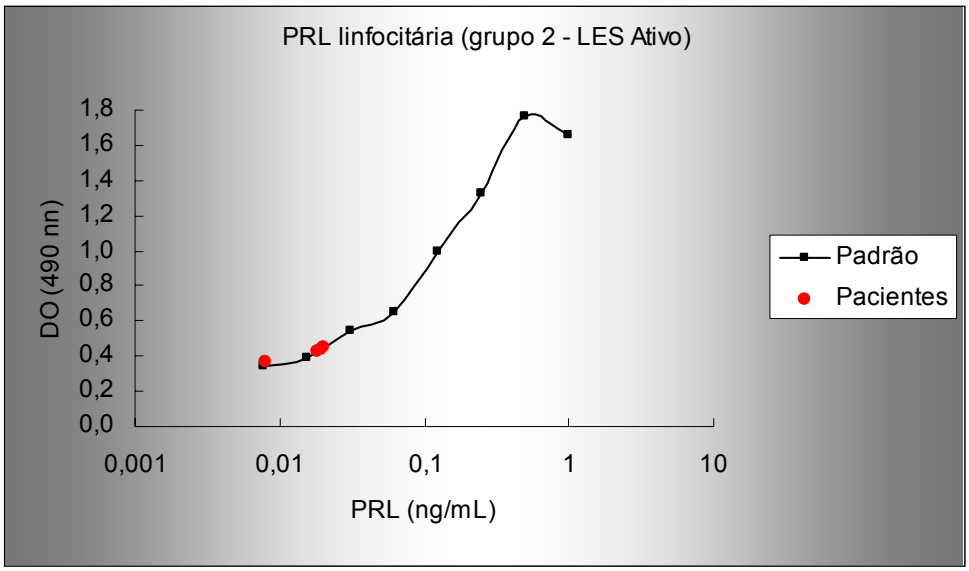

Figura 23: Ensaio 1 (Nb2): amostras (1,4,7,9 e 11) do grupo 2A (LES ativo)

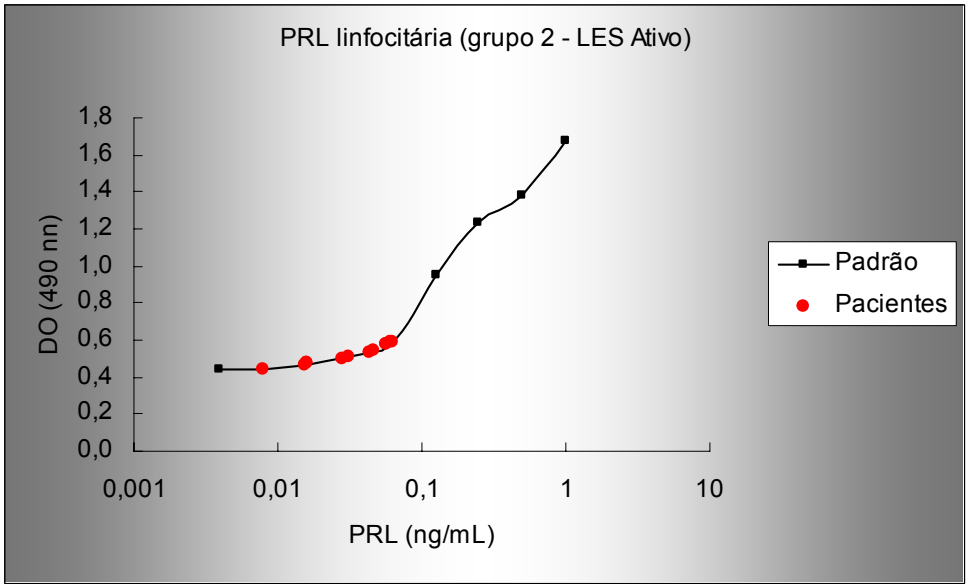

Figura 24: Ensaio 2 (Nb2): amostras (2,3,5,6,8,10, 12 ao 18) do grupo 2A (LES ativo)

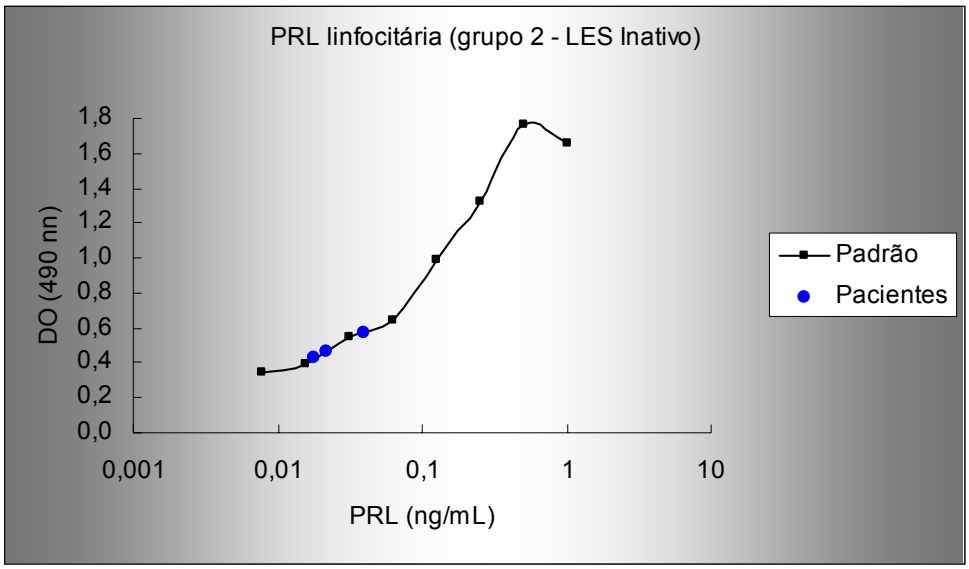

Figura 25: Ensaio 1 (Nb2): amostras (3,6,8 e 12) grupo 2B (LES inativo)

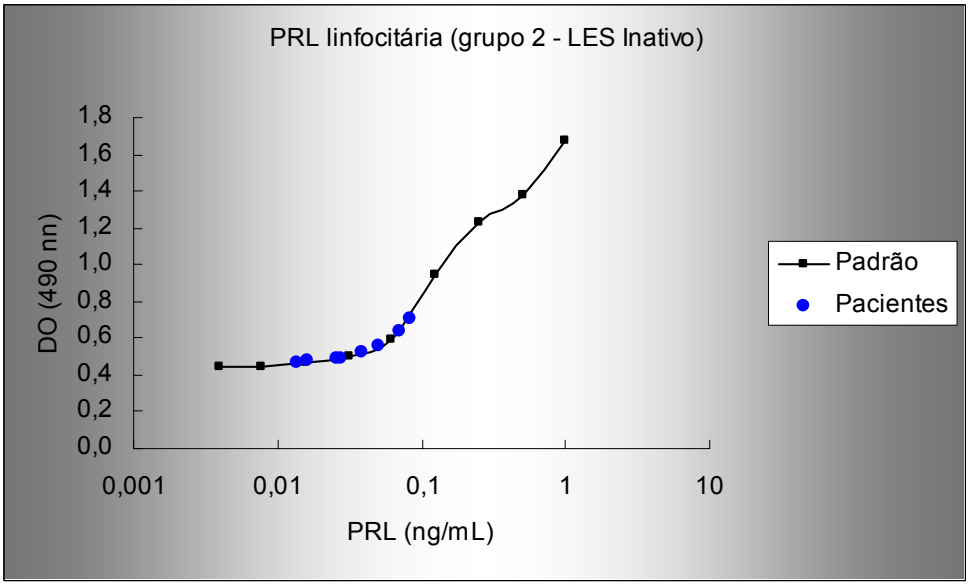

Figura 26: Ensaio 2 (Nb2): amostras (1,2,4,5,7,9,10 e 11) grupo 2B (LES inativo)

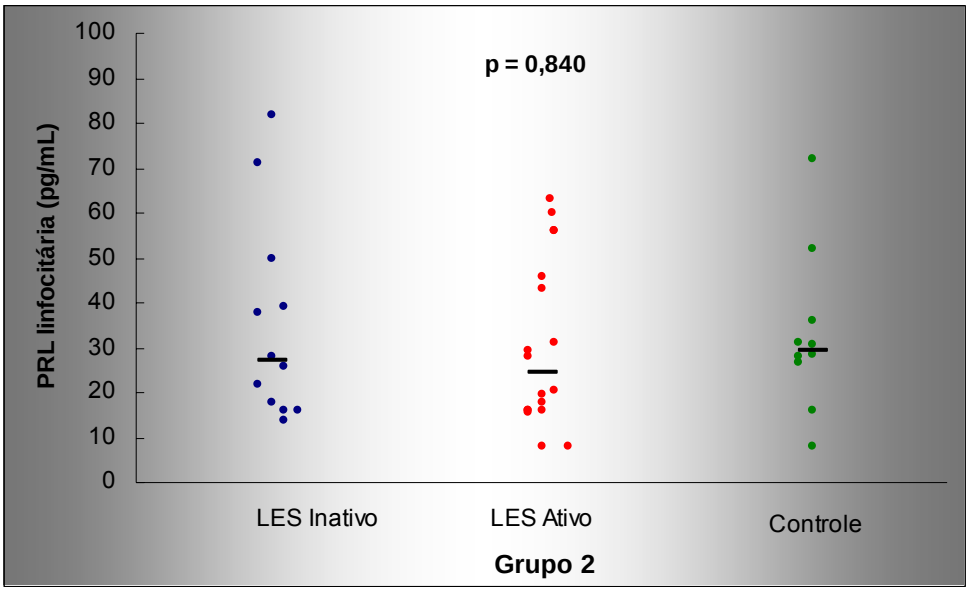

Figura 27: Comparação da mediana da PRL linfocitária entre os grupos: teste de Kruskal-Wallis (p=0,840)

Descrevemos nas tabelas 7, 8 e 9, o perfil de PRL sérica, mPRL e PRL linfocitária dos grupos 2A, 2B e controle, com as determinações das médias com DPs e as medianas. Correlacionamos o nível de PRL sérica e mPRL dos grupos 2A e 2B com o de sua respectiva PRL linfocitária e não houve correlação significante (Figuras 28 e 29).

Tabela 7: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo 2A (LES ativo)

Paciente	PRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	mPRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	PRL linfocitária (pg/mL)
1	38,9	38,9	19,5
2	23,2	23,2	15,6
3	9,2	9,2	56
4	12,3	12,3	8
5	26,3	26,3	43
6	10,4	10,4	15,8
7	20,5	20,5	18
8	23,1	23,1	28
9	16,2	16,2	20,5
10	5,2	5,2	8
11	7,1	7,1	29,5
12	7,7	7,7	46
13	9,5	9,5	31
14	5	5	63
15	11,3	11,3	16
16	10,2	10,2	16
17	15,4	15,4	56
18	7,7	7,7	60
Total	**14,4 ± 8,9** **10,8 (5 - 38,9)**	**14,4 ± 8,9** **10,8 (5 - 38,9)**	**30,5 ± 18,5** **30,5 (8 – 63)**

Tabela 8: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo 2B (LES inativo)

Paciente	PRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	mPRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	PRL linfocitária (pg/mL)
1	4,7	4,7	28
2	15,5	3,41	26
3	5,9	5,9	22
4	9,8	9,8	82
5	7,2	7,2	13,6
6	11,6	11,6	18
7	12,3	12,3	71
8	8,1	8,1	39
9	7	7	16
10	1,9	1,9	38
11	9	9	50
12	5,4	5,4	16
Total	**8,2 ± 3,1** **7,6 (1,9 – 15,5)**	**7,1 ± 3,1** **7,1 (1,9 – 12,3)**	**34,9 ± 22,4** **27 (13,6 – 82)**

Tabela 9: Perfil de PRL sérica e linfocitária: grupo controle

Paciente	PRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	mPRL sérica (VR: <14,5 ng/mL)	PRL linfocitária (pg/mL)
1	9,5	9,5	36
2	10,3	10,3	52
3	9	9	26,5
4	5,2	5,2	15,8
5	8,8	8,8	28
6	6,2	6,2	30,5
7	6,4	6,4	72
8	2,4	2,4	31
9	6,4	6,4	28,5
10	5,1	5,1	8
Total	**6,9 ± 2,4** **6,4 (2,4 – 10,3)**	**6,9 ± 2,4** **6,4 (2,4 – 10,3)**	**32,8 ± 17,9** **29,5 (8 – 72)**

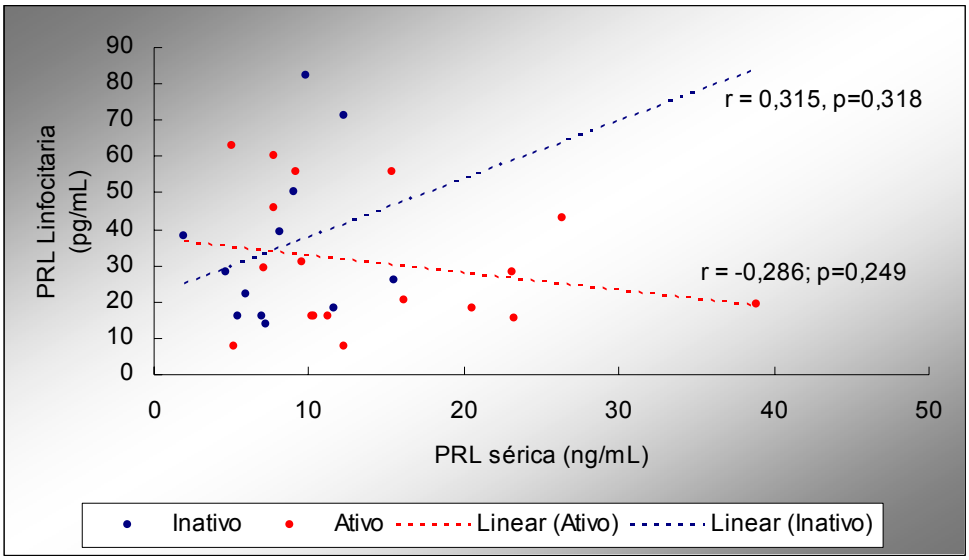

Figura 28: Correlação: PRL sérica *vs* PRL linfocitária – análise de Spearman

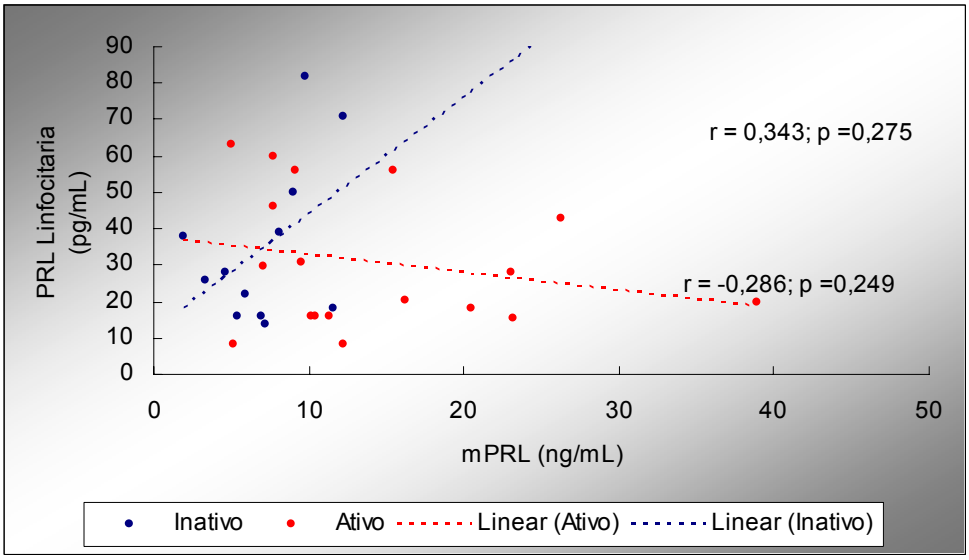

Figura 29: Correlação: mPRL *vs* PRL linfocitária – análise de Spearman

4.2.1.2 Ba/F-LLP

Apesar das padronizações deste ensaio, terem alcançado uma sensibilidade maior, não foi o suficiente para conseguimos detectar bioatividade de PRL nos grupos estudados. Nenhuma das nossas amostras alcançou o nível mínimo de DO correspondente à menor diluição da rPRL da curva padrão.

Portanto, o ensaio Ba/F-LLP não mostrou sensibilidade adequada para avaliação de PRL linfocitária.

4.2.2 RT-PCR em tempo real (grupo 2 e controle)

As seqüências amplificadas por qRT-PCR foram confirmadas através da eletroforese em gel de agarose a 2% e curva de *melting* (Figuras 30 e 31).

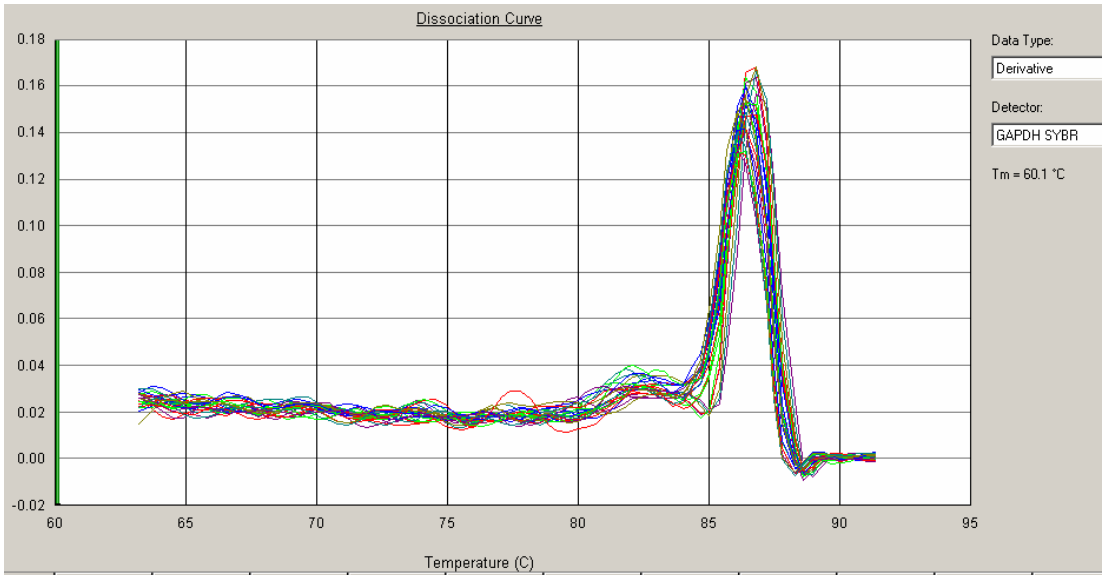

Figura 30: Curva de *melting*: gene *GAPDH*

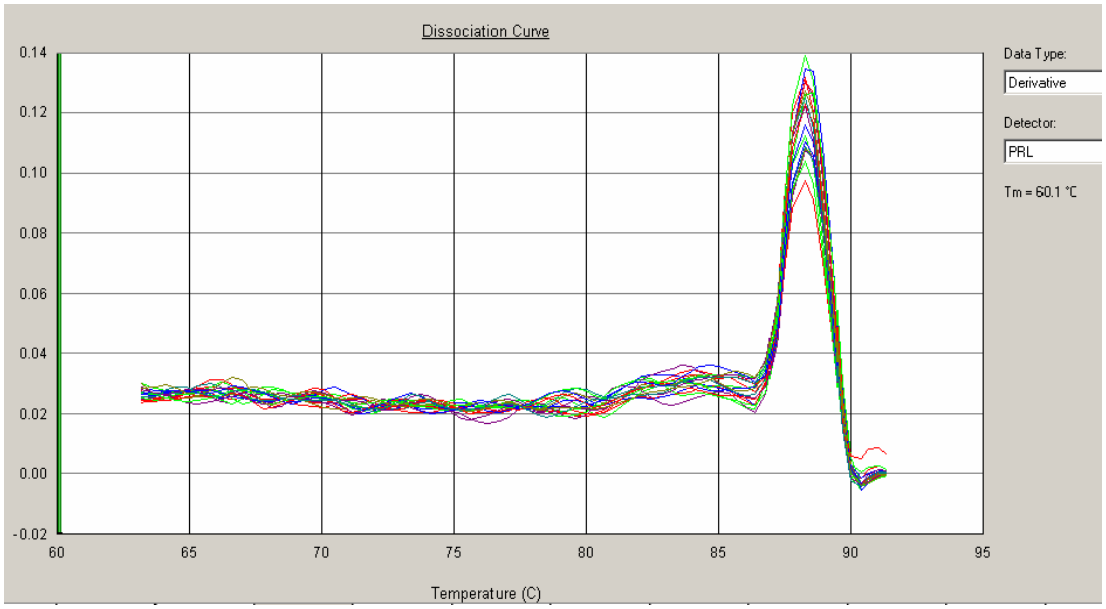

Figura 31: Curva de *melting*: gene *PRL*

Foi observada expressão semelhante do gene *PRL* no grupo 2A e 2B. Não houve diferença com significância estatística desta expressão entre os pacientes com LES ativo e inativo, e destes quando comparados ao *pool* de normais (Figuras 32 e 33)

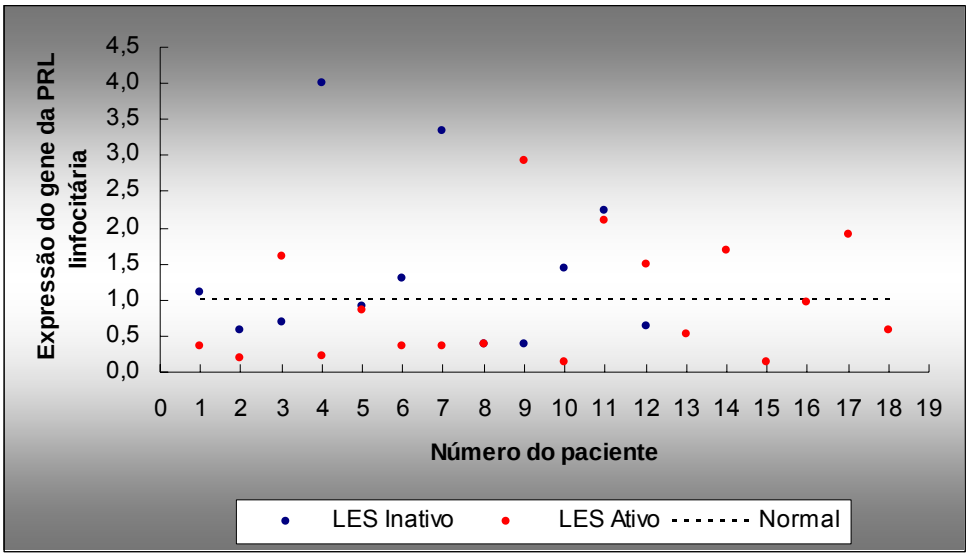

Figura 32: Quantificação relativa da expressão do gene *PRL*: grupo 2 (A e B)

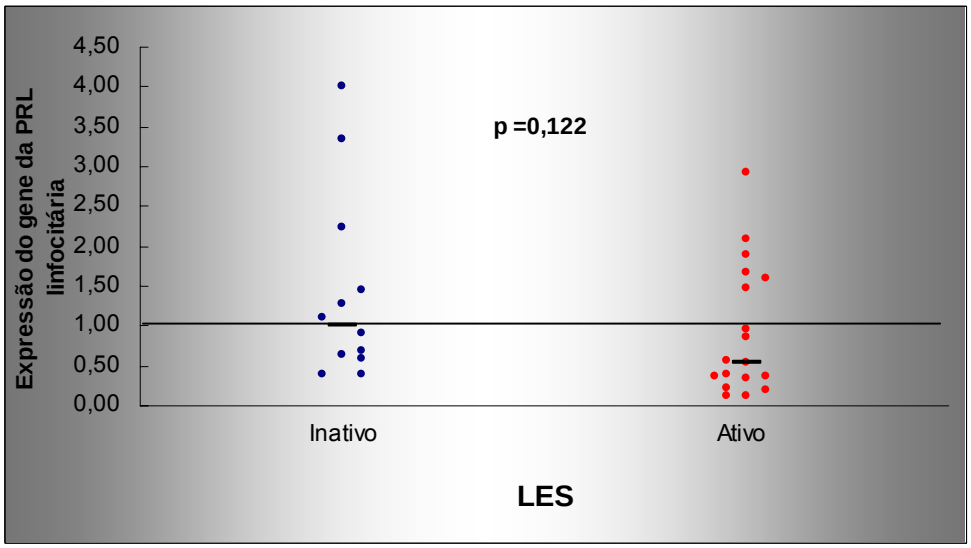

Figura 33: Mediana da expressão do gene *PRL*: grupo 2A *vs* grupo 2B (teste de Mann-Whitney: p=0,122)

Fizemos uma correlação da expressão do gene *PRL* com o nível de PRL linfocitária obtida através dos bioensaios com Nb2. Verificamos que existe uma correlação positiva significante, ou seja, mostrando que a tradução da proteína foi proporcional ao seu RNA transcrito (Figuras 34 e 35).

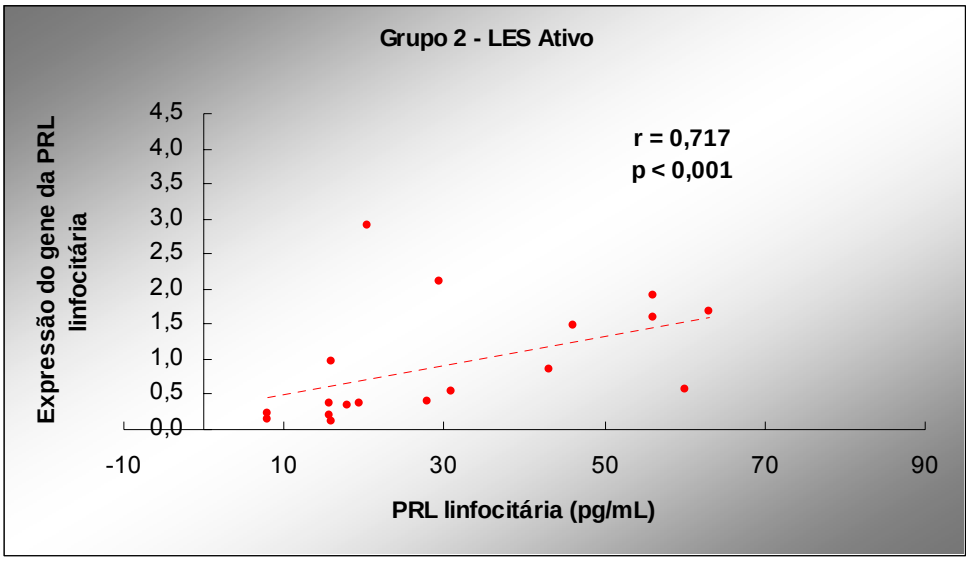

Figura 34: Correlação: expressão do gene *PRL* linfocitária *vs* nível de PRL linfocitária – análise de Spearman (grupo 2A)

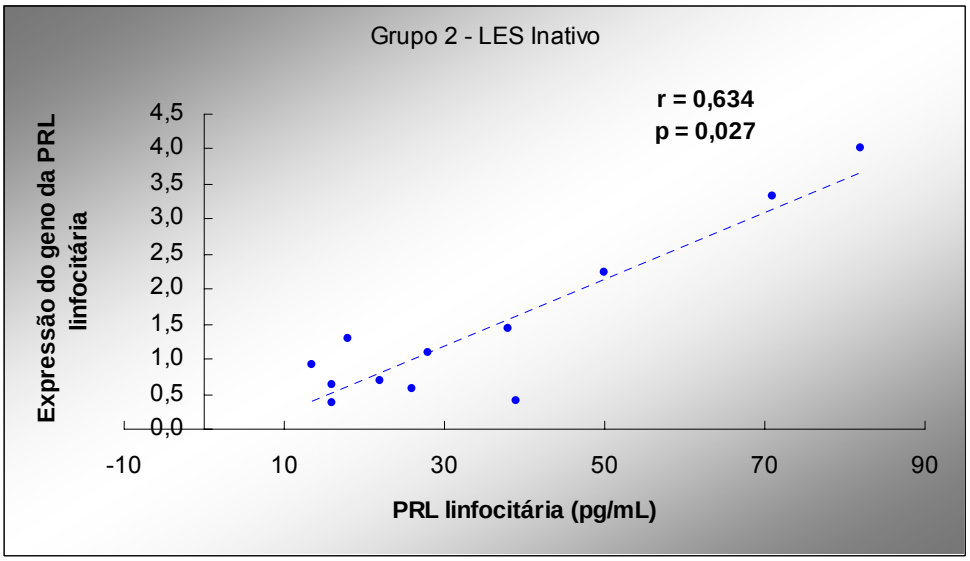

Figura 35: Correlação: expressão do gene *PRL* linfocitária *vs* nível de PRL linfocitária – análise de Spearman (grupo 2B)

5. Discussão

O tema hiperprolactinemia e auto-imunidade ainda é muito controverso na literatura, apesar de, principalmente nos últimos 10 anos, as publicações relacionadas a esse assunto terem se avolumado. A maioria dos trabalhos estuda uma população de pacientes com LES, já que esta é considerada o paradigma da doença auto-imune.

Já é consenso entre os autores que mais publicam sobre o assunto que a hiperprolactinemia está presente em cerca de 20% a 30% dos lúpicos (8% a 69,7%), em geral com níveis apenas discretamente elevados, ou seja, cerca de no máximo duas vezes o valor de referência, independentemente da atividade ou inatividade de doença. Uma correlação positiva entre aumento da PRL sérica e atividade do LES foi demonstrada em alguns trabalhos e não confirmada por outros[45-51]. É aventado que esta discordância seja devida a fatores como heterogeneidade dos pacientes lúpicos estudados, diferença de tratamentos, duração de doença, variação de índices para avaliação da atividade de doença, discrepância entre os ensaios laboratoriais para a dosagem de PRL[46] e presença de diferentes isoformas de PRL, com bioatividades distintas, como a macroprolactina (bbPRL)[52,53].

O nosso estudo apresentou prevalência de 21,9% de hiperprolactinemia sérica discreta numa casuística de 73 pacientes com LES que compôs o nosso grupo 1 (28 em atividade e 45 em inatividade de doença), estando de acordo com o descrito na literatura. Mostramos também que a hiperprolactinemia foi mais encontrada no subgrupo de lúpicos em

atividade (25%) do que em inatividade (20%). O nível sérico de PRL, no entanto, não foi estatisticamente maior no subgrupo em atividade de doença, corroborando os estudos que não demonstram correlação da hiperprolactinemia com atividade do LES.

Por outro lado, quando consideramos apenas o nível sérico de PRL monomérica no grupo 1, a porcentagem de pacientes com hiperprolactinemia caiu para 17,8%, pois três pacientes do subgrupo de LES em inatividade apresentaram nível sérico de PRL elevada às custas de macroprolactinemia. Deste modo, foi mantida a porcentagem de hiperprolactinêmicos no subgrupo com LES em atividade (25%), tendo diminuído para 13,3% no subgrupo em inatividade, com maior tendência de hiperprolactinemia entre os lúpicos em atividade.

Obviamente, o nível de PRL sérica também foi alterado, após considerarmos apenas a PRL monomérica, ou seja, a mediana do subgrupo com LES em atividade se manteve em 10,8 ng/mL (4,9 ng/mL – 38,9 ng/mL), enquanto que a mediana de PRL sérica no subgrupo com LES em inatividade caiu de 7,6 ng/mL (1,9 ng/mL - 49,6 ng/mL) para 7,2 ng/mL (1,9 ng/mL – 20,6 ng/mL), passando assim a apresentar uma diferença estatística significante. Deste modo, concordando com outros trabalhos da literatura que defendem a relação de atividade de doença com prevalência de hiperprolactinemia e nível de sérico de PRL mais alto, mesmo que esteja dentro do valor de referência.

Esses dados expostos corroboram a literatura em dois aspectos: o primeiro aspecto diz respeito ao papel das isoformas de PRL como um dos

fatores de discordância na correlação positiva entre atividade e nível de PRL sérico, como ocorreu no nosso estudo. De fato, essa isoforma (bbPRL) possui menor atividade *in vivo* e *in vitro*, quando comparada à PRL monomérica[8]; o segundo aspecto se refere ao encontro da bbPRL no nosso subgrupo em inatividade. Este fato também foi descrito em outras publicações, sugerindo-se um possível "fator protetor" da macroprolactina nesses pacientes, uma vez que se considera que a bbPRL seja um complexo da mPRL por ligação inespecífica com imunoglobulinas ou com anticorpo anti-PRL, sabidamente presente em alguns pacientes lúpicos [52,68]. Adicionalmente, estudo recente com 99 pacientes lúpicas gestantes mostrou que a presença de anticorpos anti-PRL foi mais freqüente nas que tiveram menos complicações clínicas[92].

A literatura mostra prevalência de 0,15% a 1,3% de macroprolactinemia em normoprolactinêmicos e de 15,4% a 46%, em hiperprolactinêmicos, dependendo da população estudada (sendo as maiores prevalências em laboratórios de referência), com média de 27,5% (dados compilados na referência 7). Poderíamos esperar que pacientes com LES tivessem apresentado prevalência maior de macroprolactinemia, uma vez que, sendo uma doença auto-imune, revela maior predominância de imunoglobulinas. Isto não foi observado no presente estudo: apenas três dos 73 pacientes lúpicos do grupo 1 apresentaram macroprolactinemia, demonstrando, portanto, uma prevalência de 4,1% de macroprolactinemia na totalidade da nossa população estudada, ou seja, maior do que a média geral da literatura. No entanto, dentro da nossa

população de 16 hiperprolactinêmicos, esses três pacientes perfazem uma prevalência 18,7%, semelhante à da literatura para outros grupos de hiperprolactinêmicos. Esse fato reforça a teoria de que a macroprolactinemia não é um fenômeno auto-imune e que nem toda bbPRL deriva da ligação de mPRL e imunoglobulinas, podendo ser também apenas aglomerados de PRL[54].

Uma questão também em aberto na literatura é a origem da hiperprolactinemia relacionada ao LES: hipofisária *versus* extra-hipofisária. Como já extensamente descrito na introdução, alguns indícios levam à possibilidade de etiologia extra-hipofisária, ou seja, linfocitária, já que a PRL é comprovadamente produzida na maioria das células imunológicas e funciona também com citocina[4,10,14-17]. Nenhum estudo comprovou esta questão, sendo esse o objetivo principal do nosso estudo. Para isso, utilizamos o grupo 2 e comparamos com um grupo controle de indivíduos normais.

Os bioensaios com células Nb2 não apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos, ou seja, a bioatividade da PRL linfocitária foi semelhante entre os grupo 2A (LES ativo) e grupo 2B (LES inativo) e desses quando comparados aos controles normais. O nível de PRL produzida pelos linfócitos de todos os grupos foi baixo. Este resultado é considerado confiável, por utilizar células extremamente sensíveis às quantidades mínimas de PRL, como 8 pg/mL, e ser reprodutível, como pudemos observar durante o período de padronização destes ensaios.

Esse achado abre um leque de possibilidades:

a) a PRL linfocitária, apesar de existir e ser secretada pelos linfócitos, não está implicada diretamente na patogenia do LES e nem no gatilho para atividade dessa doença, já que não foi encontrada diferença entre os grupos. Além disso, a secreção encontrada foi muito pequena para justificar o aumento sérico da PRL, corroborando o que foi sugerido recentemente por Ben-Jonathan e colaboradores[28];

b) não houve diferença entre os grupos, pois a grande maioria dos pacientes estava em uso de glicocorticóides ou outros imunossupressores, que sabidamente diminuem a produção linfocitária de interleucinas, podendo também diminuir a produção de PRL linfocitária, já que esta age localmente como citocina. Desta forma, podemos pensar que os pacientes com LES apresentaram a mesma produção *in vitro* que os controles normais, por estarem inibidos parcialmente pelo glicocorticóide. Essa dúvida poderia ser esclarecida se tivéssemos uma população de pacientes sem uso de qualquer medicação específica para o LES. No entanto, devido à gravidade da doença, a grande maioria dos pacientes já estava em uso de drogas imunossupressoras, mesmo aqueles com diagnóstico recente. Seria, portanto, antiético suspendermos essas medicações específicas para esta doença. Os poucos pacientes sem medicação, distribuídos nos dois grupos, não foram suficientes para obtermos uma comparação com valor estatístico. De qualquer

forma, a comparação entre os grupos 2A (LES ativo) e 2B (LES inativo) não mostrou diferença na produção da PRL linfocitária, estando nas mesmas condições de comparação, ou seja, em uso de glicocorticóides, na sua grande maioria. Este fato sugere que a PRL linfocitária não estaria implicada pelo menos como um gatilho na atividade;

c) a possível perda ou diminuição da atividade da PRL linfocitária secundária às congelações sucessivas das amostras (sobrenadante das culturas de linfócitos). Este questionamento é embasado em algumas publicações que mostram a labilidade da PRL a sucessivas descongelações e a temperaturas mais altas (compilação da literatura na referência 93). Este fator, todavia, justificaria somente a baixa atividade em todos os grupos, mas continuando sem diferença entre eles, já que todos foram submetidos às mesmas condições.

Esta última possibilidade pode ser descartada pelo seguinte fato: estudamos a expressão quantitativa do gene da PRL linfocitária (qRT-PCR), não descrito na literatura. Esses achados corroboraram os resultados dos bioensaios realizados, não havendo diferença estatisticamente significante na expressão do gene da PRL entre os pacientes com LES em atividade e inatividade de doença, nem destes quando comparados com *pool* de normais. Por outro lado, houve correlação positiva entre a expressão do gene da PRL linfocitária e sua bioatividade, em cada grupo respectivamente,

mostrando que o transcrito foi traduzido em proteína e que o cálculo da produção de PRL linfocitária, a partir da sua bioatividade, é confiável. O PCR em tempo real demonstrou, portanto, que a expressão do gene da PRL linfocitária é semelhante, independentemente de o indivíduo ter ou não a doença (LES), e de sua atividade ou inatividade.

Os bioensaios com a Ba/F-LLP poderiam ter ajudado a esclarecer alguma diferença de bioatividade entre os grupos, por ser um ensaio espécie-específico. Com efeito, Cardenas e colaboradores[59] mostraram que o ensaio homólogo (Ba/F-LLP) é mais discriminatório quanto à bioatividade da PRL sérica do que o bioensaio heterólogo (Nb2): pacientes com LES em atividade apresentam bioatividade da PRL sérica maior do que aqueles em inatividade quando utilizada a Ba/F-LLP, mas não quando no ensaio heterólogo. Este estudo não esclarece, no entanto, qual a origem da PRL sérica avaliada.

Os nossos bioensaios com a Ba/F-LLP, porém, não se mostraram adequados para avaliação da bioatividade da PRL linfocitária, mesmo após padronizações que visaram o aumento substancial da sensibilidade deste ensaio. Todas as amostras tiveram DO menor que a sensibilidade mínima deste bioensaio, comprovando que é menos sensível que o Nb2 para o estudo da PRL linfocitária.

Todos os nossos resultados e o que discutimos até o momento favorecem a hipótese de etiologia hipofisária para a hiperprolactinemia encontrada nos pacientes com LES. Esta afirmação está embasada pelo nosso estudo, por ter excluído um papel maior da PRL linfocitária, tanto por

estudo molecular como celular, e também por raras publicações que mostram boa resposta com uso do agonista dopaminérgico bromocriptina em ratos NZB/NZW e em pacientes com LES em atividade. Esta última é uma maneira indireta de mostrar implicação hipofisária, já que sabemos que a PRL extra-hipofisária não é controlada pelo tônus dopaminérgico.

Por outro lado, temos ainda a possibilidade para existência de hiperprolactinemia não explicada por etiologias mais comuns (drogas, prolactinoma, hipotireoidismo etc) em pacientes com LES: esta ser apenas um epifenômeno. Como já descrito na introdução, os lactotrofos são estimulados por interleucinas [2,3] em condições fisiológicas. Portanto, numa situação de auto-imunidade, onde o sistema imunológico está extremamente ativado, conseqüentemente com produção aumentada de citocinas, como as ILs e INFs, é esperado que haja um estímulo maior dos lactotrofos, aumentando desta forma a PRL sérica, mas não necessariamente levando à hiperprolactinemia em todos os pacientes. Este estímulo pode ser variável entre os indivíduos.

Novamente podemos ter duas possibilidades: a) mesmo que seja um epifenômeno, seria possível utilizar a PRL sérica como um novo marcador de atividade de doença, possibilitando um melhor seguimento destes pacientes; b) a outra possibilidade seria a real implicação da PRL hipofisária na etiologia dessa doença, justificando o uso de agonistas dopaminérgicos, como a bromocriptina e a carbergolina.

Para melhor esclarecimento destas duas últimas possibilidades, faz-se necessário um estudo complementar no qual o paciente seja o controle

dele mesmo, determinando-se o nível de PRL sérica, nas duas situações, em atividade e inatividade, o que nem sempre é exeqüível, e ensaios clínicos randomizados com drogas agonistas dopaminérgicas.

Por último, o estudo da expressão gênica do receptor de PRL nos linfócitos poderia ajudar a esclarecer a sensibilidade dos linfócitos à PRL, seja hipofisária ou extra-hipofisária. Este poderia ser um mecanismo sinérgico do estado inflamatório, podendo assim, a PRL agir de forma endócrina, parácrina e autócrina, nas mais variadas células do sistema imunológico, independentemente de sua origem.

6. Conclusões

1. A expressão do gene da PRL linfocitária foi semelhante em pacientes com LES em atividade e inatividade, e em indivíduos normais.

2. A bioatividade da PRL linfocitária não mostrou diferença entres os grupos.

3. Houve correlação positiva entre a expressão gênica da PRL linfocitária com a sua bioatividade, nos respectivos grupos, mostrando que a produção de PRL linfocitária foi proporcional ao transcrito.

4. Os dados acima descartam, a princípio, a etiologia linfocitária para a hiperprolactinemia descrita no LES.

5. A prevalência de hiperprolactinemia na nossa casuística de pacientes com LES foi de 21,9%, sendo maior nos pacientes com atividade de doença quando comparados aos em inatividade.

6. A mediana de PRL sérica foi significante maior nos pacientes com LES em atividade quando utilizados os níveis de mPRL.

7. A macroprolactinemia só foi encontrada em pacientes com LES inativo, sugerindo um possível efeito protetor da bbPRL.

7. Anexos

Anexo 1

The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus*

Criterion		Definition
1. Malar rash		Fixed erythema, flat or raised, over the malar eminences, tending to spare the nasolabial folds
2. Discoid rash		Erythematous raised patches with adherent keratotic scaling and follicular plugging; atrophic scarring may occur in older lesions
3. Photosensitivity		Skin rash as a result of unusual reaction to sunlight, by patient history or physician observation
4. Oral ulcers		Oral or nasopharyngeal ulceration, usually painless, observed by a physician
5. Arthritis		Nonerosive arthritis involving 2 or more peripheral joints, characterized by tenderness, swelling, or effusion
6. Serositis	a)	Pleuritis—convincing history of pleuritic pain or rub heard by a physician or evidence of pleural effusion
		OR
	b)	Pericarditis—documented by ECG or rub or evidence of pericardial effusion
7. Renal disorder	a)	Persistent proteinuria greater than 0.5 grams per day or greater than 3+ if quantitation not peformed
		OR
	b)	Cellular casts—may be red cell, hemoglobin, granular, tubular, or mixed
8.Neurologic disorder	a)	Seizures—in the absence of offending drugs or known metabolic derangements; e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance
		OR
	b)	Psychosis—in the absence of offending drugs or known metabolic derangements, e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance
9. Hematologic disorder	a)	Hemolytic anemia—with reticulocytosis
		OR
	b)	Leukopenia—less than 4,000/mm^3 total on 2 or more occasions
		OR
	c)	Lymphopenia—less than 1,500/mm^3 on 2 or more occasions
		OR
	d)	Thrombocytopenia—less than 100,000/mm^3 in the absence of offending drugs
10. Immunologic disorder	a)	Positive LE cell preparation
		OR
	b)	Anti-DNA: antibody to native DNA in abnormal titer
		OR
	c)	Anti-Sm: presence of antibody to Sm nuclear antigen
		OR
	d)	False positive serologic test for syphilis known to be positive for at least 6 months and confirmed by *Treponema pallidum* immobilization or fluorescent treponemal antibody absorption test
11. Antinuclear antibody		An abnormal titer of antinuclear antibody by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time and in the absence of drugs known to be associated with "drug-induced lupus" syndrome

* The proposed classification is based on 11 criteria. For the purpose of identifying patients in clinical studies, a person shall be said to have systemic lupus erythematosus if any 4 or more of the 11 criteria are present, serially or simultaneously, during any interval of observation.

Anexo 2

SLEDAI: DATA COLLECTION SHEET

Chart no.: _____ Date of Visit: _____

M.D.: _____ Patient's Name: _____

(Enter weight in SLEDAI Score column if descriptor present at the time of the visit or in the preceding 10 days.)

Weight	SLEDAI Score	Descriptor	Definition
8	_____	Seizure	Recent onset. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	_____	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	_____	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	_____	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	_____	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	_____	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	_____	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling, or effusion).
4	_____	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	_____	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	_____	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection, or other cause.
4	_____	Proteinuria	>0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	_____	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	_____	New rash	New onset or recurrence of inflammatory type rash.
2	_____	Alopecia	New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	_____	Mucosal ulcers	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations.
2	_____	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	_____	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	_____	Low complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	_____	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	_____	Fever	>38°C. Exclude infectious cause.
1	_____	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm^3.
1	_____	Leukopenia	<3,000 white blood cells/mm^3. Exclude drug causes.
TOTAL SLEDAI SCORE	_____		

Anexo 3

Tabela 3a: Características Clínicas: grupo 1A (LES ativo)

Paciente	Idade	Sexo	SLEDAI	Medicação
1	33	F	12	Prednisona/MMF
2	37	F	23	Nenhuma
3	35	F	8	Prednisona/AZA
4	25	F	8	Prednisona/DFC
5	23	F	13	Prednisona/DFC/AZA
6	36	F	15	DFC
7	20	F	6	Prednisona/DFC
8	42	F	8	Nenhuma
9	25	F	10	Prednisona/DFC/AZA
10	27	F	10	Prednisona/DFC
11	21	F	9	Prednisona/DFC
12	21	F	6	Prednisona/DFC
13	21	F	8	Prednisona/DFC
14	32	F	10	Prednisona/DFC
15	22	F	6	Prednisona/DFC/MMF
16	30	F	4	Prednisona/DFC
17	22	F	14	Prednisona/DFC
18	38	F	8	Prednisona/DFC/AZA
19	33	F	8	Prednisona/AZA
20	25	F	8	Prednisona/AZA/MTX
21	47	F	3	Prednisona
22	47	F	3	Prednisona/DFC
23	24	F	11	Prednisona/DFC
24	36	F	12	Prednisona/DFC/AZA
25	29	F	5	Prednisona/DFC
26	66	F	5	Prednisona/DFC/MTX
27	37	F	4	Prednisona/DFC/AZA
28	54	F	6	Prednisona/DFC/AZA
Total	31 (20 - 66)	28F/0M	8 (3 – 23)	26 com medicação 2 sem medicação

Tabela 3b: Características clínicas: grupo 1B (LES inativo)

Paciente	Idade	Sexo	SLEDAI	Medicação
1	32	F	0	Prednisona/DFC
2	27	F	0	DFC
3	47	M	0	Nenhuma
4	45	M	0	DFC
5	30	F	0	Prednisona/DFC
6	40	M	0	DFC/MTX
7	36	F	0	Nenhuma
8	27	F	0	Prednisona/DFC
9	40	F	0	DFC
10	48	F	0	Nenhuma
11	38	F	0	Prednisona/AZA
12	42	F	0	Prednisona/AZA/MMF
13	24	F	0	DFC
14	28	F	0	DFC
15	36	F	0	Prednisona/DFC/AZA
16	45	F	0	Prednisona/DFC
17	47	F	0	DFC/AZA
18	66	F	0	Nenhuma
19	35	F	0	Prednisona/AZA
20	64	F	0	Nenhuma
21	24	M	0	Prednisona
22	32	M	0	MTX
23	44	M	0	DFC
24	22	M	0	Prednisona/DFC/AZA
25	31	F	0	Prednisona/DFC
26	54	F	0	Prednisona
27	31	F	0	Prednisona/DFC/MMF
28	38	F	0	Prednisona/DFC
29	56	F	0	Prednisona/AZA
30	47	F	0	Prednisona/AZA
31	52	F	0	DFC
32	37	F	0	Prednisona/DFC
33	43	F	0	Prednisona/DFC/MMF
34	48	F	0	MTX
35	41	F	0	Prednisona/DFC
36	40	F	0	Prednisona/AZA
37	52	F	0	Prednisona/DFC
38	39	F	0	Prednisona/DFC/MTX
39	60	F	0	Prednisona/DFC
40	49	F	0	Prednisona/DFC
41	37	F	0	Prednisona/DFC/AZA
42	41	F	0	Prednisona
43	50	F	0	Prednisona/DFC
44	20	F	0	Prednisona/DFC/AZA
45	26	F	0	Prednisona/DFC/AZA
Total	**40 (20 - 66)**	**38F/7M**	**0**	**40 com medicação** **5 sem medicação**

8. Referências

1. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews* 2000; 80(4):1523-1631.

2. Karanth S, McCann SM. Anterior pituitary hormone control by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Apr 1;88(7):2961-5.

3. Rotiroti D, Ciriaco E, Germanà GP, Naccari F, Gratteri S, Laurà R, Abbate F, Germanà G. Stimulatory effects on lactotrophs and crop-sac of interleukin-1 and interleukin-2 in pigeons (Columba livia). *Funct Neurol* 1993 May-Jun;8(3):205-10.

4. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 1998;19(3):225-268.

5. Melmed S, Kleinberg D. Anterior Pituitary. In: Larsen, Kronenberg, Melmed and Polonsky editors. Williams Textbook of Endocrinology. 10th edition. Philadelphia: Elsevier; 2003. p. 177-279.

6. Hwang P, Guyda H, Friesen H. A radioimunnoassay for human prolactin. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 1971; 68:1902-6.

7. Glezer A. *Estudo da atividade biológica da macroprolactina humana em células Nb2 e em células Ba/F-03 transfectadas com o receptor de prolactina humano forma longa* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 122p.

8. Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD. Human macroprolactin displays low biological activity via its

homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):1048-55.

9. Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME. The tertiary structure and backbone dynamics of human PRL. *J Mol Biol.* 2003;328:1105-21

10. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects. *Endocrine Reviews* 1996;17:639-669.

11. Nagy E, Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 1991;128:2776-2784.

12. Reber PM. Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 1993;95:637-44.

13. Weigent DA. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol Ther* 1996;69:237-57.

14. Russell DH, Kibler R, Matrisian L, Larson DF, Poulos B, Magun BE. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporin. *J Immunol*. 1985;134:3027-3031.

15. Viselli SM, Mastro AM. Prolactin receptors are found on heterogeneous subpopulations of rat splenocytes. *Endocrinology* 1993;132:571-576.

16. Wu H, Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* 1996;137:349-353.

17. Sabharwal I', Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley KW, Malarkey WB. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:7713-7716.

18. Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol Endocrinol*. 1992;6:1023-1031.

19. O'Neal KD, Montgomery DW, Truong TM, Yu-lee LY. Prolactin gene expression in human lymphoid cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1992; [Suppl] 87:R19-R23

20. Gagnerault MC, Touraine I', Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol*. 1993;150:5673-81.

21. Russell DH, Mills KT, Talamantes FJ, Bern HÁ. Neonatal administration of prolactin antiserum alters the developmental pattern of T- and B-lymphocytes in the thymus and spleen of BALB/c female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:7404-7407.

22. Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production: Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 1989;125:3-12.

23. LaVoie HA, Witorsch RJ. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc Soc Exp Biol Méd*. 1995;209:257–269.

24. Lahat N, Miller A, Shtiller R, Tauby, E. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993;47:35-40.

25. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 2003;144:2102-2110.

26. Horseman N, Zhao W, Montecino-Rodriguez E et al. Defective mamopoesis, but normal hematopoiesis in mice with target disruption of prolactin gene. *EMBO J*. 1997;16:6926-35.

27. Bouchard B, Ormandy C, Di Santo J, Kelly P. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol*.1999;163:576-82.

28. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, La Pensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews* 2008;29(1):1-41.

29. Hahn BH. Systemic Lupus Eythematosus. In: Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo and Jameson editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. Internacional textbook of medicine. vol.2. 15th edition. New York: McGraw Hill Companies; 2001. p. 1922-1928.

30. Borba Neto EF, Bonfá ESDO. Lúpus Eritematoso Sistêmico. Em: editores Yoshinari NH e Bonfá ESDO. Reumatologia para o Clínico. 1ª edição. São Paulo: Roca; 2000. p. 25-34.

31. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 1982;25:1271-1277.

32. Matera, L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sciences.* 1996;59:599-614.

33. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends Endocrinol Metab.* 1993;4:147-151.

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

35. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 2007;78 Suppl 1:255-61.

36. Lavalle C, Loyo E, Paniagua R, Bermudez JÁ, Herrera J, Graef A *et al*. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*.1987;14:268-72.

37. Jara-Quezada L, Graef A, Lavalle C. Prolactin and gonadal hormones during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1991;18:349-53.

38. Jara LJ, Pacheco-Reyes H, Medina G, Angeles U, Cruz-Cruz P, Saavedra MA. Prolactin levels are associated with lupus activity, lupus anticoagulant, and poor outcome in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1108:218-26.

39. Folomeev M, Prokaeva T, Nassonova V, Masenko E, Ovtraht N. Prolactin levels in men with SLE and RA. *J Rheumatol* 1990;17:1569-70.

40. Neidhart M, Gay RE, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother*. 1999 Jun;53(5-6):218-22.

41. Straub RH, Georgi J, Helmke K, Vaith P, Lang B. In polymyalgia rheumatica serum prolactin is positively correlated with the number of typical symptoms but not with typical inflammatory markers. *Rheumatology* 2002;41:423-429.

42. De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 2005;8:25-30.

43. Peeva E, Venkatesh J, Michael D, Diamond B. Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2004; 58:310-19.

44. Kramer CK, Tourinho TF, de Castro WP, da Costa Oliveira M. Association between systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, hyperprolactinemia and thyroid autoantibodies. *Arch Med Res*. 2005 Jan-Feb;36(1):54-8

45. Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, Alcala M, Alvarez-Nemegyei J. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001;10:748-756.

46. Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, Cisneros M, Medina G, Ariza R, Espinoza LR. 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. Moszkorzová L, Lacinová Z, Marek J, Musilová L, Dohnalová A, Dostál C. Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Nov-Dec;20(6):807-12.

48. Pasoto SG, Mendonça BB, Bonfá E. Menstrual disturbances in patients with systemic lupus erythematosus without alkylating therapy: clinical, hormonal and therapeutic associations. *Lupus* 2002;11(3):175-80.

49. 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.

50. 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.

51. Jara LJ, Lavalle C, Fraga A, Gómez-Sanchez C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Germain BF, Espinoza LR. Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1991 Apr;20(5):273-84.

52. Cruz J, Avinã-Zubieta A, de la Escalera GM, Clapp C, Lavalle C. Molecular heterogeneity of prolactin in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1331-1335.

53. Leaños-Miranda A, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001 Apr;44(4):866-75.

54. Hattori N, Ikekubo K Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol*. 1994;130:438-45.

55. McMurray RW, Allen SH, Braun AL, Rodriguez F, Walker SE. Longstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: possible hormonal stimulation of an autoimmune disease. *J Rheumatol.* 1994;21:843-850.

56. Reuman PD. First reported pediatric case of systemic lupus erythematosus associated with prolactinoma. *Arthritis Rheum*. 2004 Nov;50(11):3616-8.

57. Li M, Keiser HD, Peeva E. Prolactinoma and systemic lupus eythematosus: do serum prolactin levels matter? *Clin Rheumatol*. 2006;25:602-605.

58. Caturegli P, Newschaffer C, Olivi A, Pomper MG, Burger PC, Rose NR Autoimmune hypophysitis. Endocr Rev. 2005 Aug;26(5):599-614. Epub 2005 Jan 5.

59. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA. Lupus and pregnancy: ten questions and some answers. *Lupus* 2008;17(5):416-20.

60. Chavez-Rueda.K, Legorreta-Haquet VM, Cervera-Castillo H, Sánchez L, Jara LJ, Zenteno E, Chavez-Sanchez L, Blanco-Favela F. Effect of prolactin on lymphocyte activation from systemic lupus erythematosus patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1108:157-65.

61. Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Oucipo G, Carino C et al. 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* 1997;82:3664-9.

62. Berwaer M, Martial JA, Davis JR. Characterization of an upstream promoter directing extrapituitary expression of human prolactin gene. *Mol Endocrinol*. 1994;8:635-42.

63. Méndez I, Alcocer-Varela J, Parra A, Lava-Zavala A, de la Cruz DA, Alarcón-Segovia D, Larrea F. Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin. *Lupus* 2004;13(1):45-53.

64. Stevens A, Ray DW, Worthington J, Davis JR Polymorphisms of the human prolactin gene--implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10(10):676-83.

65. Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, Marchini M, Scorza R, Giovanna Danieli M, Leone M, Ferro I, Liguori M, Trojano M, Ballerini C, Massacesi L, Cannoni S, Bomprezzi R, Momigliano-Richiardi P. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2003 Feb;64(2):274-84.

66. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker SE. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1995;22:2084-91.

67. Walker SE. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:762-768.

68. Jara LJ, Cruz-Cruz P, Saavedra MA, Medina G, García-Flores A, Angeles U, Miranda-Limón JM Bromocriptine during pregnancy in systemic lupus erythematosus: a pilot clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Sep;1110:297-304.

69. Cárdenas-Mondragón G, Ulloa-Aguirre A, Isordia-Salas I, Goffin V, Leaños-Miranda A. Elevated serum bioactive prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity as disclosed by homologous receptor bioassays. *J Rheumatol*. 2007 Jul;34(7):1514-21.

70. Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly PA. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):400-22.

71. Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 1997 sep;40(9):1725.

72. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH/ Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. 1992 Jun;35(6):630-40.

73. Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinemia: validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clin Endocrinol*. 1999; (51): 119-26.

74. Hauache OM, Rocha AJ, Maia Jr ACM, Maciel RMB, Vieira JGH. Screening for macroprolactinemia and pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol.* 2002; 57: 327-31.

75. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RMB. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem*. 1988; 44(8): 1758-9.

76. Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest*. Suppl. 1968;97:31-50.

77. Harris R, Ukaejiofo EO. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. *Br J Haematol*. 1970 Feb;18(2):229-35.

78. Tanaka T, Shiu RPC, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*.1980; 51(5): 1058-63.

79. Ali S, Pellegrini I, Kelly PA. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem*.1991; 266 (30):20110-7.

80. Bernichtein S, Jeay S, Vaudry R, Kelly PA, Goffin V. New Homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine.* 2003; 20(1-2): 177-90.

81. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.

82. Mattheus N, Ekramoddoullah AK, Lee SP. Isolation of high-quality RNA from white spruce tissue using a three-stage purification method and subsequent cloning of a transcript from the PR-10 gene family. *Phytochem Anal*. 2003;14(4):209-15.

83. Wacker MJ, Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech*. 2005 Sep;16(3):266-71.

84. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug;29(1):23-39.

85. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001 Dec;25(4):386-401.

86. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (capítulo 20). In: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology, v. 132, Totowa, New Jersey, Human press. P. 365-386, 2000.

87. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res*. 1997 Aug 15;25(16):3235-41.

88. Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol*. 2002;30:503-12.

89. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006 Feb 22;7:85.

90. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.

91. Rosner B. Fundamentals of Biostatistics. Boston, PWS Publishers, 2nd edition, 1986, 584pp.

92. Leaños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Ulloa-Aguirre A, Isordia-Salas I, Parra A, Ramírez-Peredo J. Anti-prolactin autoantibodies in pregnant women with systemic lupus erythematosus: maternal and fetal outcome. *Lupus 2*007;16(5):342-9.

93. Soares CR*, Ueda EK, Oliveira TL, Gomide FI, Heller SR, Bartolini P.* Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields*. J Biotechnol.* 2008 Jan 1;133(1):27-35. Epub 2007 Aug 30.