

Originales

Antecedentes. Aunque existen múltiples evidencias sobre los efectos reguladores de la prolactina (Prl) sobre la respuesta inmune tanto humoral como mediada por células, no se conoce cuál es la función de esta hormona en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El objetivo de la presente investigación fue determinar si existen cambios en las concentraciones de Prl inmunorreactiva (determinadas por radioinmunoensayo [RIA]), bioactiva (bioensayo con células Nb₂) o en las isoformas de pesos moleculares en las muestras plasmáticas o en los medios de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de varones infectados con el virus del sida.

Métodos. Se estudió la producción de Prl *in vivo* e *in vitro* en 20 varones no tratados infectados con el VIH y un grupo de 14 varones sanos. Los estudios se realizaron en condiciones basales de ayuno o bajo estimulación de la síntesis de Prl por administración de metoclopramida endovenosa y toma de muestras a intervalos de 30 min durante 5 h.

Resultados. En los varones infectados con el virus del sida las concentraciones de Prl bioactiva –aunque no las de Prl inmunorreactiva– en ayunas fueron superiores ($p = 0,03$), pero durante la prueba de estimulación las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva fueron inferiores en los varones infectados ($p \leq 0,01$).

En los sujetos controles se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva ($r = 0,728$), mientras que en los infectados el coeficiente de correlación fue de 0,041. La forma molecular mayoritaria encontrada en las muestras plasmáticas de los sujetos controles y varones infectados por el virus del sida fue la de 23,5 kDa. La síntesis de Prl bioactiva por los cultivos de las CMSP de los pacientes infectados con el virus del sida (grupo II) no se estimuló por la adición de concanavalina A (Con A), a diferencia con las células de los sujetos sanos (grupo I). Sin embargo, las concentraciones en condiciones basales de cultivo siempre fueron mayores para las células mononucleares de los varones infectados con el virus del VIH.

Conclusiones. Los resultados demuestran que los pacientes infectados con el virus del sida tienen un tono dopaminérgico disminuido, que sus células linfocitarias no son capaces de sintetizar Prl como respuesta a la estimulación mitogénica y que se pierde la correlación entre las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva debido a mecanismos asociados a la presencia de la enfermedad. Las diferencias entre las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva encontradas entre los dos grupos no están relacionadas con la presencia de distintas formas polimórficas de la hormona.

Palabras clave: Prolactina. Actividad biológica de la prolactina. Prolactina y sida. Prolactina plasmática. Prueba de estimulación con metoclopramida.

Actividad biológica e inmunológica de la prolactina en varones infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana

V.M. CABRERA OLIVA^a y J. SARRACENT PÉREZ^b

^aInstituto Nacional de Endocrinología. Hospital Comandante M. Fajardo. Ciudad de La Habana. Cuba. ^bDepartamento de Parasitología. Instituto Nacional de Medicina Tropical Pedro Kourí. Ministerio de Salud Pública. Ciudad de La Habana. Cuba.

BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF PROLACTIN IN MEN WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION

Background. Although the regulatory effects of prolactin (PRL) on the humoral and cell mediated immune response are well documented, the biological, immunological and structural characteristics of this hormone in serum samples from men infected with human immunodeficiency virus (HIV) infection are unknown. The aim of this study was to determine whether differences exist in concentrations of immunoreactive PRL (determined by radioimmunoassay), biologically active PRL (Nb₂ bioassay), in the molecular weight of PRL isoforms in plasma samples and in the culture media of peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected men compared with healthy men.

Methods. PRL production was studied *in vivo* and *in vitro* in 20 untreated HIV-infected men and in 14 clinically healthy HIV-negative men. Blood samples were extracted under fasting conditions and after the PRL-stimulatory test with endovenous metoclopramide at 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 minutes.

Results. In HIV-infected men fasting bioactive (but not immunoreactive) PRL concentrations were higher ($p = 0,03$), but stimulated PRL concentrations (both immunoreactive and bioactive) were lower than in healthy men throughout the stimulatory test ($p \leq 0,01$). In healthy men, a positive correlation was found between immunoreactive and biologically active PRL concentrations ($r = 0,728$), while in HIV-infected men the correlation coefficient was 0,041. In both groups of men, the predominant circulating PRL isoform had a molecular weight of 23.5 kDa. A non-stimulatory effect of the mitogen on the synthesis of PRL-like substances was observed when mononuclear cells from HIV-infected men were incubated in the presence of concanavalin-A. The opposite occurred in cells from healthy controls. However, in basal (non-stimulated) cultures the concentration of bioactive PRL-like substances in the conditioned medium from peripheral blood mononuclear cells was higher in HIV-infected men than in healthy controls.

Conclusions. The results of this study demonstrate that HIV-infected men show reduced dopaminergic tone, that lymphocytes are unable to synthesize PRL in response to mitogenic stimulation and that the correlation between bioactive and immunoreactive PRL is lost due to mechanisms associated with HIV-infection. The differences in concentrations of bioactive and immunoreactive PRL found between both groups were unrelated to the presence of different polymorphic forms of the hormone.

Key words: Prolactin. Bioactive prolactin. Prolactin and AIDS. Plasma prolactin. Metoclopramide stimulatory test.

La síntesis de la prolactina (Prl) no está limitada a las células hipofisarias, pues actualmente se conoce una amplia variedad de órganos,

Correspondencia: Dr. Víctor M. Cabrera Oliva.
Departamento de Reproducción Humana. Instituto Nacional de Endocrinología.
Hospital Comandante M. Fajardo.
Zapata y Calle D. Vedado. Ciudad de La Habana 10400. Cuba.
Correo electrónico: vcabrera@inend.sld.cu

Manuscrito recibido el 28-8-2002; aceptado para su publicación el 9-12-2002.

tejidos y células capaces de sintetizar moléculas que, según sus propiedades biológicas e inmunológicas, son idénticas a la Prl de origen hipofisario^{1,2}. Durante los últimos años se ha confirmado la síntesis de Prl, la expresión de sus ácidos ribonucleicos mensajeros (mARN) o la de sus receptores en los linfocitos T y B, en los esplenocitos y en diferentes líneas celulares de origen linfocitario^{3,4}. Algunos autores, utilizando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que la Prl tiene un marcado efecto inmunorregulador sobre la respuesta inmune humoral y mediada por células^{5,6}, y que puede actuar mediante mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos^{7,8}.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la síntesis de Prl a nivel hipofisario se encuentra regulada por un mecanismo inhibitorio tónico mediado por la dopamina (DA)⁹. Hasta el presente no se ha podido demostrar cuál o cuáles son los mecanismos que regulan la síntesis y liberación de Prl sintetizada en los órganos exocrinos, aunque se ha informado sobre la existencia de un sistema dopaminérgico localizado en los linfocitos T¹⁰.

Dentro de las características biológicas comunes para las formas hipofisaria y ectópica de la Prl se encuentra la existencia de un marcado polimorfismo molecular^{11,12}. Esta propiedad de la Prl es la que regula su actividad biológica y condiciona a esta hormona para participar en más de 300 funciones fisiológicas en las más diversas especies de mamíferos. Además de las funciones clásicamente conocidas que son reguladas por la Prl (desarrollo de las glándulas mamarias y síntesis de caseína), esta hormona participa en la regulación de la respuesta inmune^{13,14}. En muestras plasmáticas de pacientes con enfermedades de tipo autoinmune, como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoidea (RA) y otras, se han encontrado niveles elevados de Prl inmunorreactiva^{15,16}. En los medios de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con LES se han encontrado concentraciones variables de Prl bioactiva, que pueden ser determinadas mediante bioensayo con las células Nb₂ de linfoma de ratas^{17,18}.

De acuerdo con sus propiedades biológicas, sus mecanismos de transducción de señales y la estructura de sus receptores, la Prl es una hormona pleotrópica que ha sido clasificada como una verdadera citocina o como una hormona con doble función^{19,20}.

La determinación de la concentración basal de la Prl y su respuesta a la administración intravenosa de un agente bloqueador de la dopamina, como es la metoclopramida, se ha considerado como un buen índice para evaluar el estado del tono dopaminérgico hipotálamico bajo diferentes condiciones clínicas²¹.

Debido a su condición de molécula con doble función, la Prl puede estar implicada en la regulación e interacciones normales o patológicas que se establecen entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmunológico. Sin embargo, hasta el presente no se han iniciado estudios dirigidos a establecer si las formas biológicamente activas de la Prl tienen alguna relación

con la instalación o con la evolución del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), que se caracteriza por la destrucción completa de los mecanismos inmunológicos de defensa del organismo.

El objetivo de la presente investigación fue explorar si existen cambios en las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva o en sus variantes de pesos moleculares en las muestras plasmáticas o en los medios de cultivo de CMSP de pacientes infectados por el virus del sida, tanto bajo condiciones basales como bajo estimulación de la síntesis de Prl con metoclopramida.

SUJETOS Y MÉTODO

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética Médica del Hospital General de Puebla, México. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los sujetos que participaron en forma voluntaria en el estudio. El estudio se desarrolló de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Sujetos

En el estudio participaron 34 varones voluntarios divididos en dos grupos:

– Grupo I. En él se incluyeron 14 varones sanos, VIH-negativos, con una edad de $25,4 \pm 2,3$ años (media \pm DE), con un índice de masa corporal (IMC) de $24,0 \pm 1,8$ kg/m² (media \pm DE) y una cifra de linfocitos de $689 \pm 208 \times 10^6$ células/l (media \pm DE).

– Grupo II. En este grupo se incluyeron 20 varones infectados por VIH, clasificados como C₂ (n = 3) y C₃ (n = 17). Los casos fueron de reciente diagnóstico y no estaban bajo ningún tratamiento antirretroviral, con edades de $26,9 \pm 6,3$ años (media \pm DE) y con un IMC de $22,1 \pm 2,81$ kg/m² (media \pm DE). El diagnóstico de infección por VIH se confirmó mediante análisis de *Western blot* del anticuerpo anti-VIH. El conteo de los linfocitos CD4⁺ fue de $104 \pm 112 \times 10^6$ células/l (media \pm DE). Las células T que expresaban las moléculas CD4 y CD8 se contabilizaron por citometría de flujo de tres colores con una mezcla de anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8²².

La carga viral se determinó en catorce voluntarios del grupo II utilizando reactivos Nuclisens HIV-1 QT (Organon Teknika, Boxtet, Países Bajos), que es un ensayo basado en la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos (NAS-BA) para la determinación del ARN de VIH-1 en suero humano²². La carga viral media fue de 10.000 copias/ml de plasma. La infección por VIH se clasificó de acuerdo a los criterios revisados del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (1992).

La totalidad de los 34 voluntarios que participaron en el estudio fueron clínicamente eutiroideos con concentraciones séricas normales en ayunas de T3 total y hormona estimuladora del tiroides (TSH), y ninguno se encontraba tomando medicamentos con efectos hiperprolactinémiantes al menos cuatro meses antes de comenzar el estudio.

Protocolo experimental

Todos los individuos se estudiaron de la misma forma: entre las 08.00 y las 08.30 y después de un período de ayunas de 10-12 horas durante la noche, se les colocó un catéter en la vena antecubital y se mantuvo permeable mediante

una perfusión intravenosa lenta de NaCl 0,15 M.

Se tomaron tres muestras de sangre no heparinizada a intervalos de 15 min (-30, -15 y 0) y posteriormente a los 30, 60, 90, 120, 240 y 300 min, después de haber suministrado un bolo intravenoso de 10 mg de metoclopramida intravenosa (Carnotprim, Laboratorios Carnot, México, DF).

En cada toma de muestra se descartaron 0,3 ml de sangre para evitar los efectos de dilución. Durante el estudio no se permitió a los sujetos ningún tipo de actividad física, fumar o dormir. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.000 rpm, se separó el suero y se conservó a -20 °C hasta proceder a los análisis hormonales, a la determinación de la actividad biológica de la Prl y a la electroforesis.

Análisis hormonales

Las determinaciones hormonales se realizaron por duplicado utilizando reactivos para radioinmunoensayo (RIA) suministrado por Ortho (Ortho Clinical Diagnostics Ltd, Amersham, Reino Unido) y reactivos inmunoradiométricos para la determinación de TSH.

Los reactivos para la determinación de Prl se calibraron contra el estándar de referencia IRP 75/504 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y los reactivos para la determinación de TSH se calibraron contra el segundo IRP 80/558. Los coeficientes de variación inter e intraensayos para las concentraciones de Prl < 500 mU/l (25 µg/ml) fueron $\leq 7,2$ y $\leq 8,5\%$, respectivamente, y para las concentraciones de Prl entre 500 y 3.000 mU/l, de ≤ 6 y $\leq 7,8\%$, respectivamente.

Obtención de las CMSP y establecimiento de los cultivos primarios

Las CMSP se obtuvieron a partir de la muestra tomada en el tiempo -30 min (muestra basal). Las células mononucleares se separaron mediante centrifugación de la muestra de sangre heparinizada obtenida de los sujetos sanos y de varones infectados con el virus del sida en un gradiente de Ficoll-Hypaque²². Las CMSP se recuperaron de la interfase del gradiente, se lavaron repetidamente por centrifugación con medio RPMI y se resuspendieron finalmente en el medio libre de suero AIM-V (AIM-V, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) a una densidad de 2×10^5 células/0,15 ml de medio. La viabilidad de las células se determinó por exclusión del azul tripano, y siempre fue superior al 95%. Los cultivos se establecieron en placas de 96 pozos de fondo redondo y el medio fue suplementado con antibióticos, en presencia o en ausencia de una concentración óptima de concanavalina A (Con A) previamente establecida (1,5 µg/ml) para lograr la activación máxima del ciclo celular. Las células se incubaron durante 72 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo se recolectó y se conservó a -20 °C hasta la determinación de la actividad biológica de la Prl.

Determinación de la actividad biológica de la Prl

Las células Nb₂ utilizadas en el presente estudio fueron donadas por el Dr. P.W. Gout (Vancouver, Canadá), y la actividad biológica de la Prl secretada por los cultivos de las CMSP estimuladas o no con Con A se determinó de acuerdo con el método descrito por Tanaka²³, con ligeras modificaciones. Las células se mantuvieron a 37 °C en medio Fischer (Gibco, EE.UU.), que contiene 10% de suero fetal bovino (SFB) como fuente de lactógeno, 10% de suero de

caballo (SC), 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Veinticuatro horas antes del bioensayo las células se pasaron al medio Fischer descrito anteriormente, con SFB al 1% y SC al 10%, y se centrifugaron durante 3 min a 800 xg en una centrifuga refrigerada. Finalmente las células se resuspendieron en medio Fischer con antibióticos y SC al 10%, a una densidad de 5×10^5 células/ml de medio de cultivo, y se sembraron en placas múltiples de fondo redondo (50.000 células/pozo). El crecimiento celular se estimuló por adición de concentraciones crecientes de Prl recombinante humana (rec-hPrl, Genzyme Diagnostic, Cambridge, MA, EE.UU.). La actividad biológica de la Prl en las muestras del medio condicionado de los cultivos de las CMSP estimuladas o no con Con A se determinó directamente o en diluciones seriadas, para confirmar el paralelismo con la curva patrón. Los cultivos por triplicado se incubaron durante 72 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire y 95% de humedad. Los efectos de la Prl o de los medios de cultivo sobre la proliferación de las células Nb₂ se determinaron como expresión directa de la D.O.595 nm de las sales de formazán producidas por las deshidrogenasas mitocondriales sobre el sustrato XTT, siguiendo los procedimientos descritos por los fabricantes (Proliferation KIT II, Boehringer, Manheim, Alemania).

Electroforesis e inmunoblott de las muestras plasmáticas y medios de cultivo condicionados

Las muestras de suero de los sujetos sanos y de pacientes infectados con el virus del sida obtenidas durante la prueba de estimulación con metoclopramida se agruparon en tres lotes: lote 1, compuesto por las muestras obtenidas en los tiempos -30, -15 y 0 min (muestras basales); lote 2, formado por las muestras obtenidas en los tiempos 30, 60, 90 y 120 min; lote 3, compuesto por las muestras obtenidas en los tiempos 180, 240 y 300 min. Las muestras séricas y los medios condicionados de los cultivos de las CMSP se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo anti-Prl VLS-2 (Dr. Y.N. Sinha, Instituto Whittier for Diabetes and Endocrinology, La Jolla, CA, EE.UU.) durante 72 h a 4 °C. Los precipitados obtenidos después de adicionar un anticuerpo anti-IgG de conejo "levantado" en chivo²⁴ se resuspendieron y se disolvieron en el tampón para muestras del Laemmli y se calentaron a 100 °C durante 5 min. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli²⁵. Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en el tampón de SDS-PAGE que contiene un 20% de metanol en ausencia de SDS de acuerdo con procedimiento descrito por Towbin²⁶. Las membranas se fijaron y se visualizaron por autorradiografía después de incubar durante 1 h con proteína A marcada con NaI¹²⁵ (200.000 cpm/ml). Después de lavar repetidamente con una solución tampón de TRIS-NaCl, pH 7,4, las membranas se secaron bajo corriente de aire y se sometieron a autorradiografía durante 72 h a -70 °C.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para las comparaciones entre las concentraciones medias de Prl inmunorreactiva (RIA) y bioactiva (Nb₂) intragrupos e intergrupos se realizó mediante el test de la t de Student para series pareadas y no pareada

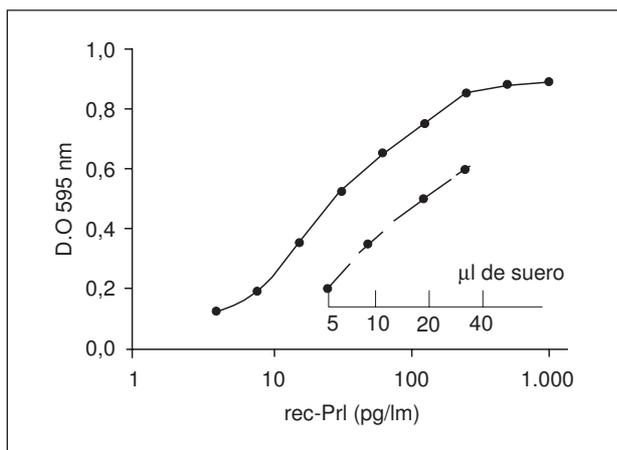


Fig. 1. Curva dosis-respuesta de las células Nb₂ a la prolactina recombinante humana (rec-hPrl; línea continua) y actividad de Prl en cantidades variables de muestras de sueros de varones infectados con el virus del sida (línea discontinua). Las células se incubaron en medio libre de suero en presencia de concentraciones crecientes de rec-hPrl o de cantidades proporcionales de muestras de suero. Los cultivos se incubaron durante 72 h y la proliferación celular se determinó midiendo la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales con el método del XTT.

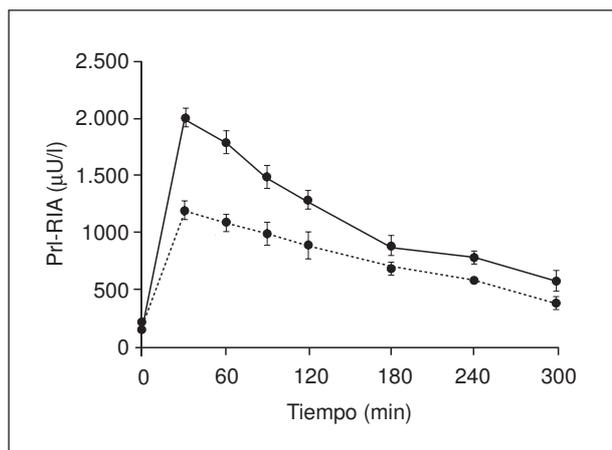


Fig. 2. Determinación de la concentración de prolactina inmunológicamente activa (Prl-RIA) en las muestras séricas de sujetos sanos (línea continua) o de varones infectados con el virus del sida (línea discontinua). Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DE) de tres determinaciones. Las primeras cinco muestras se tomaron a intervalos de 30 min, y el resto, cada hora. El tiempo de duración de la prueba de estimulación fue de 5 h.

das. Valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las correlaciones entre variables se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. En todas las correlaciones los valores utilizados representan la media \pm ES de muestras analizadas por triplicado en experimentos que fueron repetidos al menos tres veces.

RESULTADOS

Curva dosis-respuesta del cultivo de las células Nb₂ para la determinación de la actividad biológica de la Prl en las muestras séricas y en los medios de cultivo de las CMSP

Cuando las células Nb₂ se expusieron a la Prl humana recombinante (rec-hPrl) (fig. 1) se observó un aumento en la D.O.595 nm en una forma dosis dependiente (línea continua). Cuando se añadieron diferentes cantidades (μ l) de suero humano o del medio condicionado de cultivo de las CMSP se obtuvo una curva dosis-respuesta que fue paralela a la generada por la adición de la hormona recombinante (línea discontinua). Para comprobar si la adición de Con A presente en los medios de cultivo estimulados con este mitógeno no inducía la proliferación de las células Nb₂, se añadieron concentraciones variables de Con A. No se encontró ningún efecto del mitógeno sobre la proliferación celular. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo para el bioensayo con células Nb₂ fueron 3,4 y 6,2%, respectivamente. El rango dinámico del bioensayo fue de 3,9 hasta 500 pg/ml, y la sensibilidad, de 1,9 pg/ml.

Determinación de las concentraciones de Prl inmunorreactivas durante la prueba de estimulación con

metoclopramida

Las concentraciones basales de Prl séricas estuvieron dentro de los rangos normales en los 34 sujetos que participaron en el estudio, y las concentraciones promedio fueron similares para los grupos I y II (156 ± 66 frente a 146 ± 88 mU/l). Después de la administración de la metoclopramida intravenosa apareció un aumento bien marcado a los 30 min en ambos grupos ($p < 0,0001$), pero a partir de este tiempo y hasta los 300 min siguientes las concentraciones fueron disminuyendo de forma consecutiva (fig. 2).

Durante toda la prueba de estimulación con metoclopramida, las concentraciones de Prl fueron menores en el grupo II que en el grupo I, lo que fue mucho más evidente durante los primeros 120 min ($p \leq 0,0001$) que en los tiempos de 180 a 300 min ($p \leq 0,01$).

Determinación de las concentraciones de Prl bioactiva (Nb₂) durante la prueba de estimulación con metoclopramida

Las concentraciones basales medias de actividad biológica de la Prl determinadas por el ensayo de las células Nb₂ en las muestras séricas (fig. 3) fueron mayores en el grupo II que en el grupo I (122 ± 52 frente a 88 ± 38 mU/l; $p = 0,03$). En ambos grupos apareció un aumento rápido a los 30 min ($p < 0,0001$), seguido por una disminución lenta de las concentraciones. Durante los tiempos de 30, 60, 90 y 180 min el grupo II mostró una concentración de Prl biológicamente activa inferior al grupo I ($p \leq 0,01$).

Correlación entre las concentraciones de Prl

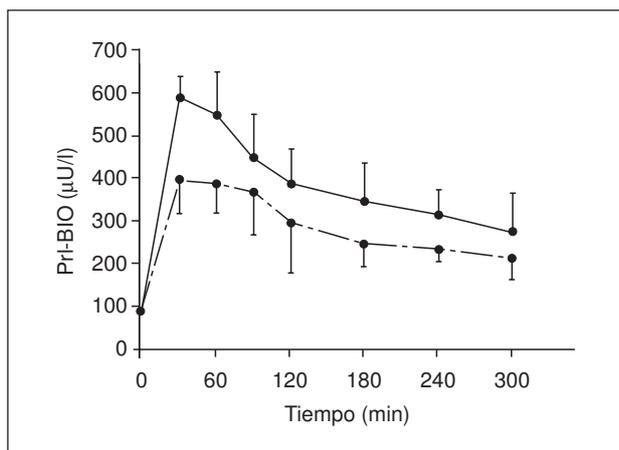


Fig. 3. Determinación de la concentración de prolactina biológicamente activa (Prl-BIO) en las muestras séricas de sujetos sanos (línea continua) o de varones infectados con el virus del sida (línea discontinua). Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DE) de tres determinaciones. Las primeras cinco muestras se tomaron a intervalos de 30 min, y el resto, cada hora. El tiempo de duración de la prueba de estimulación fue de 5 h.

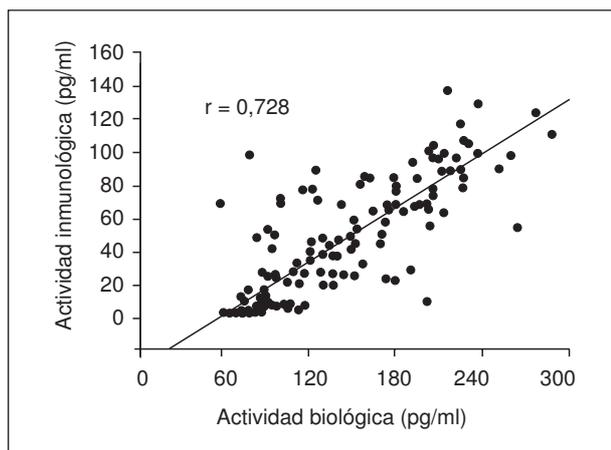


Fig. 4. Determinación de la correlación entre las concentraciones de prolactina determinadas por bioensayo con las células Nb₂ y por radioinmunoensayo (RIA) en las muestras de los sujetos sanos. Cada punto representa la determinación para cada sujeto en el tiempo dado. El coeficiente de correlación fue de $r = 0,728$.

inmunorreactiva y bioactiva en varones infectados con el virus del sida y en sujetos controles sanos

El coeficiente de correlación entre las concentraciones de Prl inmunorreactiva (Prl-RIA) y Prl bioactiva (Prl-BIO) fue de 0,73 dentro del grupo de sujetos sanos (fig. 4), mientras que para el grupo de varones infectados con el virus del sida se observó una pérdida de correlación entre las dos magnitudes medidas ($r = 0,041$) (fig. 5).

Relaciones entre las concentraciones séricas de Prl bioactiva e inmunorreactiva

La media de relación entre las concentraciones basales de Prl inmunorreactiva y bioactiva (Prl-BIO/Prl-RIA) fue mayor en el grupo II que en el grupo I ($0,96 \pm 0,39$ frente a $0,59 \pm 0,22$, respectivamente; $p = 0,01$). Durante la prueba de estimulación por administración intravenosa de metoclopramida, la relación entre las concentraciones de Prl bioactiva e inmunorreactiva fue mayor en el grupo II que en el grupo I ($0,36 \pm 0,17$ frente a $0,29 \pm 0,06$, respectivamente; $p = 0,01$), y en los tiempos posteriores no se observaron cambios estadísticamente significativos. La relación entre las concentraciones de Prl BIO/RIA también fue mayor en el grupo II que en el grupo I a los 60 min ($0,39 \pm 0,18$ frente a $0,29 \pm 0,06$, respectivamente), a los 90 min ($0,44 \pm 0,20$ frente a $0,31 \pm 0,11$, respectivamente), y a los 120 min ($0,40 \pm 0,21$ frente a $0,25 \pm 0,10$, respectivamente; $p \leq 0,02$).

Determinación de las concentraciones de Prl bioactiva

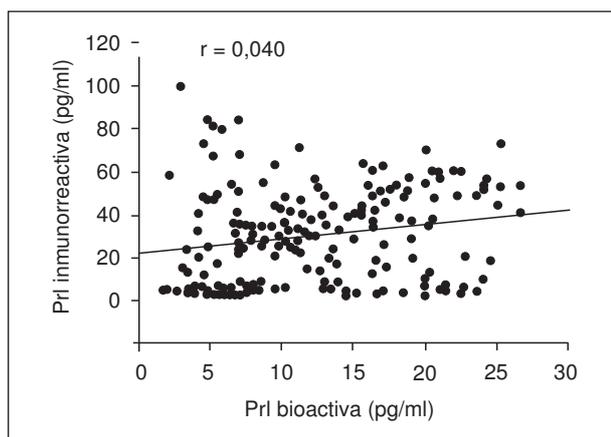


Fig. 5. Determinación de la correlación entre las concentraciones de prolactina determinadas por bioensayo con las células Nb₂ y por radioinmunoensayo (RIA) en las muestras de varones infectados con el virus del sida. Cada punto representa la determinación para cada sujeto en el tiempo dado. El coeficiente de correlación fue de $r = 0,040$.

sintetizada por las CMSP

En el grupo II, las concentraciones de Prl producidas por los cultivos de las CMSP bajo condiciones basales fueron de $34,0 \pm 9,1$ pg/ml, pero disminuyeron a $7,0 \pm 3,5$ pg/ml después de añadir Con A ($p = 0,01$). En contraste en el grupo I, las concentraciones de Prl biológicamente activa producidas por las células mononucleares bajo condiciones basales que fueron de $20,6 \pm 11,4$ pg/ml aumentaron hasta $58,4 \pm 37,7$ pg/ml después de suplementar los cultivos con Con A ($p =$

0,01). La producción de Prl bioactiva por los cultivos de células mononucleares bajo condiciones basales de cultivo fueron mayores en el grupo II que en el grupo I ($p = 0,04$), mientras que cuando se añadió Con A se observó el efecto contrario ($p = 0,004$).

DISCUSIÓN

El presente estudio ha demostrado que las concentraciones basales de Prl inmunorreactivas (Prl-RIA) son similares en los grupos I y II, pero que el grupo II presenta una respuesta estimuladora disminuida con relación al grupo I. La actividad biológica de la Prl-BIO es paralela a las concentraciones de Prl-RIA, aunque se observó una diferencia muy importante: las concentraciones basales medias de Prl-RIA fueron muy similares en ambos grupos, pero la actividad de la Prl-BIO fue mayor en los infectados con el virus del sida que en el grupo de controles sanos.

La respuesta disminuida de la actividad de Prl-RIA y de Prl-BIO en los infectados con el virus del sida y en el grupo de sujetos controles sanos que han sido sometidos a la prueba de estimulación de la secreción de Prl con metoclopramida, no ha sido observada para otros tipos de medicamentos (los pacientes no estaban tomando ningún tipo de medicamento) o durante las dietas para disminuir el IMC, aunque no se ha encontrado disminución en las concentraciones de Prl plasmática incluso en los casos de malnutrición extrema²⁷. Tampoco este fenómeno puede ser explicado por la existencia de un estado de estrés extremo como puede ser la fase grave del sida, ya que en estos pacientes no se ha detectado la presencia de un hipercortisolismo, o por la síntesis o liberación exagerada de una forma molecular isomérica de la Prl, como es el caso de mujeres con LES¹⁸, ya que estos pacientes en su plasma sólo tienen la forma monomérica normal como es el caso de los sujetos normales. En los infectados con el virus del sida y en el grupo de sujetos normales, la banda de Prl que apareció teñida en forma más intensa fue la variante molecular de 23,5 kDa y se correspondió con los tiempos donde se encontró la mayor actividad inmunológica y biológica de la Prl (lote 30, 60, 90 y 120 min).

Los estudios de correlación entre las concentraciones de Prl-RIA y Prl-BIO demostraron que en el grupo I el coeficiente de correlación es superior a 0,72, pero se observó que en el grupo II se pierde esta correlación, lo cual indica que en los varones infectados con el virus del sida se producen cambios significativos en la actividad biológica e inmunológica de la Prl que pueden estar asociados con los mecanismos de control de la síntesis o liberación de esta hormona.

Las concentraciones séricas basales de Prl se consideran como un marcador sensible del contenido de DA hipotalámica en la práctica clínica²⁸, y la administración de metoclopramida (un agente antidopaminérgico) se ha utilizado como una vía indirecta para eva-

luar el nivel funcional del tono dopaminérgico hipotalámico. Un aumento en la respuesta de Prl-RIA a la administración de metoclopramida intravenosa se ha interpretado como una evidencia directa del aumento del tono de DA endógena²⁹. En contraste, la disminución de la concentración de Prl-RIA y Prl-BIO como respuesta a la metoclopramida, como se ha observado en los pacientes del grupo II, puede representar la existencia de un tono dopaminérgico disminuido pero no ausente³⁰. El hallazgo de una actividad biológica basal media de Prl más alta en el grupo II que en el grupo I apoya la idea de un tono dopaminérgico disminuido en el grupo de pacientes infectados con el virus del sida³¹. El efecto general en esta enfermedad podría ser mantener la síntesis de Prl tan alta como sea posible como un posible mecanismo de adaptación para la supervivencia³². La existencia de un tono dopaminérgico disminuido parece ser una explicación plausible, aunque otros investigadores han encontrado concentraciones bajas de DA³³ y de sus metabolitos³⁴ y niveles elevados de Prl^{35,36} en el fluido cerebrospinal de pacientes infectados con el virus del sida.

El hallazgo en el grupo II de una relación mayor que en el grupo I entre la Prl-BIO y la Prl-RIA tanto en condiciones basales como durante las dos primeras horas del estudio sugiere que, proporcionalmente, la disponibilidad de Prl biológicamente activa es mayor en los pacientes infectados con el virus del sida que en los individuos sanos, aunque sería necesario planear y desarrollar otras investigaciones con las cuales se pudiera dar una explicación satisfactoria a esta hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a todos los pacientes y sujetos controles que participaron en el estudio, y a los Laboratorios Clínicos y Hematológicos de Puebla, México. Agradecemos las facilidades y recursos brindados por el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Esta investigación fue financiada en parte por el Programa de Investigaciones en Reproducción Humana de Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, así como por una beca de entrenamiento del Programa Latinoamericano de Investigaciones en Reproducción Humana (PLACIRH).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, RW Steinmetz. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996;17:639-69.
2. Goffin V, Nadine B, Philippe T, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* 2002;64:47-67.
3. Wu H, Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* 1996;137:349-53.
4. Pellegrini I, Lebrum JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor on human lymphoid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992;6:1023-9.
5. Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;198:513-27.
6. Gagnerault MC, Touraine P, 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.
7. Goffin V, Bouchard B, Ormandy CJ, Weimann E, Ferrag F, Touraine P. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoenocrinology. *Ann NY Acad Sci* 1998;840:498-509.
 8. Schwartz C, De Paverts SV, Clarke I, Rao A, Ray D, Vrana K. Paracrine interactions within the pituitary gland. *Ann NY Acad Sci* 1998;839:239-43.
 9. Freeman ME, Kanycska B, Lerant B, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80:1523-631.
 10. Bergquist T, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12912-6.
 11. Sinha YN. Structural variant of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995;16:354-69.
 12. Neidhart N. Prolactin in autoimmune diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:408-19.
 13. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends Endocrinol Metab* 1993;4:147-51.
 14. Leañós-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;44:866-75.
 15. Leañós-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2619-24
 16. Walker SE, Allen SH, Hoffman RW, McMurray RW. Prolactin: a stimulator of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995;4:3-9.
 17. Larrea GF, Castillo AM, Cabrera OV. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen stimulated and non-stimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3664-9.
 18. Ferrag F, Buteau H, Kelly PA. Immune functions of prolactin (PRL) and signal transduction by PRL/GH/cytokine receptors: specificity, redundancy and lessons from chimaeras. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997;3:197-213.
 19. Gouilleux F, Moritz D, Humar M, Moriggi R, Berchtold S, Groner B. Prolactin and interleukin-2-receptor in T lymphocytes signal through a MGF-STAT5-like transcription factor. *Endocrinology* 1995;136:5700-8.
 20. Parra A, Ramírez-Peredo J, Larrea F, Cabrera-Oliva V, Coutiño B, Torres I, et al. Decrease dopaminergic tone and increase bioactive prolactin in men with immunodeficiency virus infection. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001b;54(6):731-8.
 21. Ruiz-Arguelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Clin Chim Acta* 1992;211:513-27.
 22. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-98.
 23. Tanaka T, Shiu RPC, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormone measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1058-63.
 24. Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW. Detection of a high molecular weight variant of prolactin in human plasma by a combination of electrophoretic and immunologic techniques. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:752-4.
 25. Lammli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
 26. Towbin H, Stachelin T, Ordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
 27. Medeiros-Neto GA, Sucupira M, Knobel M, Cintra AU. Prl, TSH and thyroid hormone response to TRH in adult protein-calorie malnutrition. *Horm Metab Res* 1977;9:524-5.
 28. Bacher R, Scheibenreiter S, Blau N, Bieglmayer C, Frisch H, Waldhauser F. Hyperprolactinemia, a tool in treatment control of tetrahydrobiopterin deficiency: endocrine studies in an affected girl. *Pediatr Res* 1998;43:472-7.
 29. Quigley ME, Judd SJ, Gilliland GB, Yen SSC. Effects of dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin in normal women and in women with hyperprolactinemic anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:718-20.
 30. Parra A, Barron J, Marin VA, Coutiño B, Belmont J, Coria I. Acute dopaminergic blockade augments the naloxone-induced LH rise in estrogen-treated postmenopausal women. *Maturitas* 1997;27:91-9.
 31. Scaloni MF, Weigtman DR, Shale DJ, Mora B, Health M, Snow MH, et al. Dopamine is a physiological regulator of thyrotropin (TSH) secretion in normal man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1979;10:7-15.
 32. Parra A, J Ramírez-Peredo. The uncoupled coupled. Prolactin and CD4 lymphocytes in HIV infection. *Med Hypotheses* 1999;53:425-8.
 33. Berger JR, Kumar M, Fernandez JB, Levin B. Cerebrospinal fluid dopamine in HIV-1 infection. *AIDS* 1994;8:67-71.
 34. Candito M, Durant J, Gurle V, Chambon P, Dellamonica P. Cerebrospinal fluid 5-hydroxyindolacetic acid and homovanillic acid in AIDS dementia complex. *AIDS* 1995;9:1100-1.
 35. Montero A, Fernández MA, Cohen JE, Luraghi MR, Sen L. Prolactin levels in the cerebrospinal fluid of patients with HIV infection and AIDS. *Neurol Res* 1998;20:2-4.
 36. Parra A, Ramírez-Peredo J, Larrea F, Cabrera-Oliva V, Torres I, Reyes-Núñez V, et al. Serum prolactin is associated with apoptosis in men with human immunodeficiency virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001a;79:285-90.