



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PROLACTINA COMO AGENTE ANTIAPOPTÓTICO EN CONDROCITOS

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
(Neurobiología)

PRESENTA

Biól. María Norma Adán Castro

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez - L.

COTUTOR DE TESIS

Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández



Campus Juriquilla, Querétaro, México
Julio de 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: María Norma Adán Castro es: “Estudio del efecto de la prolactina como agente antiapoptótico en condrocitos”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Carmen Aceves Velasco

Secretario (Tutor)

Dr. Ma. del Carmen Clapp Jiménez

Vocal

Dr. Andrés Quintanar Sthepano

Suplente

Dr. Maricela Luna Muñoz

Suplente

Dr. Teresa Edith Garay Rojas

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

La apoptosis de los condrocitos juega un papel importante en la sustitución del cartílago por hueso durante el crecimiento y en diversas artropatías. La prolactina (PRL) y su receptor están presentes en condrocitos articulares y su administración *in vivo* protege al cartílago del efecto proapoptótico de citocinas pro-inflamatorias (cit). Las cit: interleucina-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) promueven la degradación del cartílago al estimular la producción de óxido nítrico (NO) y la actividad de metaloproteasas de matriz (MMP) en condrocitos. Las MMP procesan proteolíticamente a la prolactina hacia vasoinhibinas (Vi), una familia de péptidos con propiedades anti-angiogénicas y pro-inflamatorias. En este trabajo usamos cultivos primarios de condrocitos articulares para evaluar los efectos directos de PRL y Vi sobre la apoptosis y la producción de NO en condrocitos. La PRL inhibió la apoptosis de los condrocitos inducida por 24 horas de incubación con una mezcla de las cit mencionadas, evaluada mediante ELISA, e inhibió la expresión de p53 inducida por las mismas. En contraste, las Vi estimularon de manera dosis-dependiente la apoptosis de los condrocitos. Las cit promovieron la producción de NO (determinada por Griess) y el bloqueo de dicha producción con L-NAME inhibió la apoptosis de los condrocitos inducida por cit. Sin embargo, ni la PRL ni las Vi modificaron la producción basal de NO o inducida por cit, sugiriendo que sus efectos sobre condrocitos involucran mecanismos independientes del NO. En conclusión, este trabajo muestra que la PRL contiene en su molécula la capacidad de promover e inhibir la supervivencia de los condrocitos, y que el resultado final de estos efectos podría depender de la actividad de MMP producidas por los condrocitos bajo condiciones inflamatorias. El entendimiento de estos mecanismos podría contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos y/o la prevención de artropatías que cursan con la degradación del cartílago.

SUMMARY

Chondrocytes apoptosis plays an important role in physiological processes such as replacement of cartilage by bone during growth, but also in arthritic pathologies. Prolactin (PRL) receptors have been localized in chondrocytes and the *in vivo* treatment with this hormone, protects cartilage against the proapoptotic effect of proinflammatory cytokines (cyt). Cyt, including interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α), promote cartilage degradation by stimulating the production of nitric oxide (NO) and the activation of matrix metalloproteases (MMP). MMP are able to proteolytically process PRL to vasoinhibins, a family of PRL fragments with anti-angiogenic and proinflammatory properties. Here, we used primary cultures of articular chondrocytes to investigate the direct effects of PRL and vasoinhibins on chondrocyte apoptosis and NO production. PRL, at all doses tested, inhibited the apoptosis of chondrocytes induced by the incubation for 24-hour with a mixture of above cyt as determined by ELISA and the down-regulation of p53 expression. In contrast, vasoinhibins elicited a dose-dependent stimulation of chondrocyte apoptosis. The cyt stimulated NO production and blockage of NO production with L-NAME prevented their effect on chondrocyte apoptosis. However, neither PRL nor vasoinhibins modified basal or cyt-induced NO production as determined by the Griess reaction, indicating that their opposing effects on chondrocyte apoptosis are independent of NO signaling. Altogether these results suggest that the PRL molecule has the potential to exert opposing effects on chondrocyte survival and that the resulting action depends on the activity of MMP produced by chondrocytes under inflammatory conditions. Understanding these mechanisms may be of preventive and therapeutic value in inflammatory arthropathies characterized by cartilage degradation.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez y la Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro, y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de becario 509003113.

Agradezco el apoyo invaluable de las siguientes personas:

La dirección académica del comité tutorial integrado por los Doctores: Ma. del Carmen Clapp Jiménez, Isabel Cristina Méndez Hernández, Maricela Luna Muñoz y Victor Ramírez Amaya.

El apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera.

La asistencia de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

El apoyo del MVZ. Martín García Servín, responsable del bioterio del Instituto de Neurobiología.

La asistencia de la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefe de la unidad de enseñanza. Estudios de posgrado.

ÍNDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
2. ANTECEDENTES.....	- 3 -
2.2 Osteoartritis	- 5 -
2.3 Artritis Reumatoide	- 5 -
2.4 Citocinas pro-inflamatorias y el cartílago articular artrítico	- 6 -
2.5 Apoptosis.....	- 9 -
2.6 Apoptosis en el cartílago	- 12 -
2.7 La prolactina.....	- 13 -
2.8 Vasoinhibinas	- 16 -
2.9 Efectos opuestos de la prolactina y las vasoinhibinas.....	- 18 -
2.10 Prolactina, vasoinhibinas y condrocitos	- 19 -
3. JUSTIFICACIÓN.....	- 21 -
4. HIPÓTESIS	- 21 -
5. OBJETIVOS.....	- 21 -
5.1 Objetivos generales	- 21 -
5.2 Objetivos particulares.....	- 22 -
6. MATERIAL Y MÉTODOS	- 22 -
6.1 Reactivos	- 22 -
6.2 Métodos.....	- 23 -
7. RESULTADOS.....	- 26 -
7.1 Efecto de la PRL sobre la apoptosis de los condrocitos inducida por citocinas pro-inflamatorias.....	- 26 -
7.2 Efecto de las citocinas pro-inflamatorias y de la PRL sobre la producción de NO ..	- 28 -
7.3 Efecto de las vasoinhibinas sobre la apoptosis de los condrocitos	- 29 -
8. DISCUSIÓN.....	- 31 -
9. CONCLUSIONES	- 39 -
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 40 -
11. ÍNDICE DE FIGURAS	- 53 -

1. INTRODUCCIÓN

El cartílago es un tejido clave en las articulaciones por su capacidad para absorber y resistir la presión que genera la ejecución de movimiento. Los condrocitos son el único tipo celular presente en el cartílago y de su supervivencia depende la integridad del mismo. La muerte de los condrocitos es parte de procesos fisiológicos como la sustitución del cartílago por hueso durante el crecimiento (Poole, 1991), y también lo es de patologías como la osteoartritis y la artritis reumatoide (AR) (Aigner y McKenna, 2002). La AR es un padecimiento crónico inflamatorio que afecta las articulaciones del 0.5 al 1% de la población adulta (Gabriel, 2001; Scott, 2007) de la cual el 75% son mujeres (Scott, 2007). En la AR, la inflamación de la membrana sinovial y la infiltración de células inmunocompetentes a la cavidad articular generan una masa de tejido inflamatorio capaz de invadir y destruir al cartílago mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas (Dayer, 2003; Sen, 2005). La severidad del daño en el cartílago artrítico, ha sido correlacionada con la apoptosis de los condrocitos (Hashimoto *et al.*, 1998).

Evidencias recientes indican la participación de la hormona prolactina (PRL) en la fisiopatología del cartílago. Tanto la PRL (Macotella *et al.*, 2006) como su receptor (Zermeño *et al.*, 2006) son expresados en condrocitos de la articulación. Además, pacientes con AR cursan con hiperprolactinemia (Seriolo *et al.*, 2002) y contienen PRL en el líquido sinovial (Ogueta *et al.*, 2002). Asimismo, la PRL es capaz de proteger a los condrocitos de la apoptosis en condiciones inflamatorias. Estudios de nuestro laboratorio mostraron que la administración de PRL en ratas inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por la inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) (Guzmán-Morales, 2008), y además, que el efecto proapoptótico de estas citocinas es mayor en ratones knock-out para el receptor de PRL que en ratones silvestres (Adán, 2008). Cabe mencionar que las citocinas pro-inflamatorias estimulan la producción de factores proapoptóticos como el óxido nítrico (NO), y estimulan la actividad de metaloproteasas de matriz (MMPs) capaces de procesar proteolíticamente a la PRL hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos con propiedades antiangiogénicas y promotoras de la inflamación, que también han sido detectadas en los condrocitos del cartílago articular (Macotella *et al.*, 2006).

En este proyecto, investigamos si la PRL puede actuar directamente sobre los condrocitos para protegerlos contra la apoptosis inducida por citocinas pro-inflamatorias y si dicho efecto protector involucra al NO. Asimismo, dado a que las citocinas estimulan la producción de MMP capaces de generar vasoinhibinas, determinamos si las vasoinhibinas afectan la supervivencia de los condrocitos. Los resultados de este trabajo sugieren que ambas proteínas influyen sobre la supervivencia del cartílago y que el equilibrio entre la producción de PRL y su conversión a vasoinhibinas define el efecto hormonal final.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cartílago y condrocitos

El cartílago es un tejido de tipo conectivo especializado en brindar soporte al cuerpo y está constituido por un único tipo de células llamadas condrocitos. Si bien estas células son capaces de producir y secretar los componentes de su matriz extracelular (Jeffrey y Watt, 2003), el hecho de que su tasa de proliferación y recambio sean bajas reduce la posibilidad de regeneración del cartílago. Por otra parte, el cartílago es un tejido avascular que requiere de una fuente capaz de proporcionar los nutrientes y eliminar los desechos de los condrocitos. Estas acciones son llevadas a cabo por el líquido sinovial producido por la membrana sinovial que recubre la articulación (Jeffrey y Watt, 2003).

Con base en la composición de la matriz extracelular, se han descrito tres tipos de cartílago: elástico, fibroso y hialino (Jeffrey y Watt, 2003). El cartílago elástico contiene colágena tipo II, y se localiza en el pabellón auricular, en las paredes del canal auditivo externo, en las trompas de Eustaquio y en la epiglotis de la laringe. El cartílago fibroso contiene colágena tipo I y II, es un componente de los discos intervertebrales, de los meniscos, y de las uniones de los tendones a los huesos (Benjamin y Ralphs, 1998). El cartílago hialino, forma parte del esqueleto fetal, del esqueleto nasal, laríngeo, traqueal y torácico (Bahrami *et al.*, 2001), sirve de guía para el crecimiento de los huesos mediante la llamada osificación endocondral (Bahrami *et al.*, 2001) y constituye al cartílago articular, uno de los principales componentes de la articulación.

Las articulaciones, son aquellas estructuras del cuerpo formadas por la unión de dos huesos, que pueden o no presentar movimiento. En las articulaciones móviles, los huesos en sus extremos distales presentan el cartílago articular justo en la región que establece la vecindad entre ambos huesos (Fig 1). La importancia de este tejido, radica en su capacidad para evitar que ambos huesos se rocen durante la ejecución del movimiento.

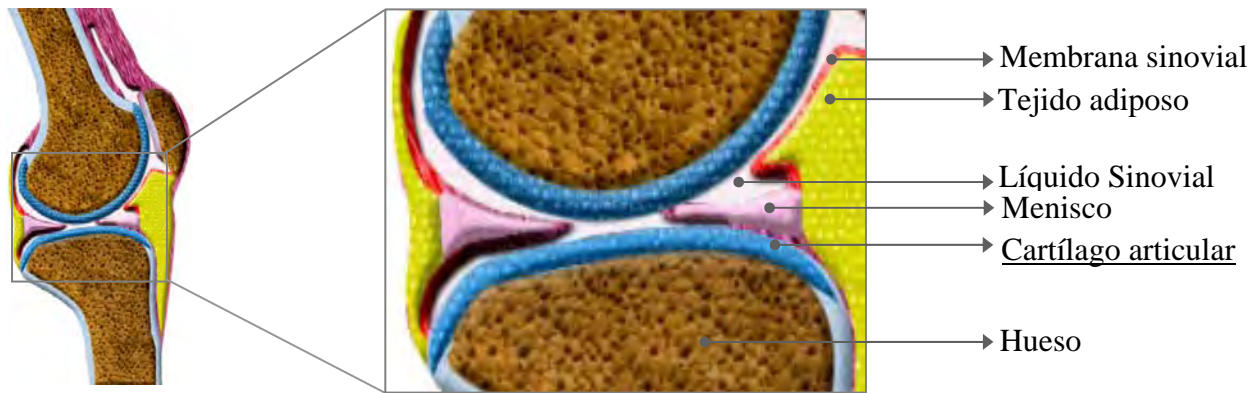


Figura 1. Imagen representativa de una articulación móvil (rodilla) donde se indican cada uno de sus componentes.

El análisis histológico del cartílago articular muestra que los condrocitos se encuentran inmersos y encapsulados en matriz extracelular, la cual, está constituida principalmente por colágena tipo II, proteoglicanos y agua. La colágena II constituye el 50% del peso seco del cartílago (Jeffrey y Watt, 2003), sus fibras son resistentes a la tensión y refuerzan a las moléculas de proteoglicanos que son mecánicamente sensibles (Heinegard y Oldberg, 1989). Si bien éste es el principal tipo de colágena (Jeffrey y Watt, 2003) presente en el cartílago hialino, también se observan pequeñas cantidades de colágena VI, IX, X y XI (McCauley y Disler, 1998). En relación a los proteoglicanos, éstos presentan una constitución molecular que incluye cadenas de polisacáridos (glicosaminoglicanos) como los sulfatos de condroitina y de queratán unidos covalentemente a una base proteica que a su vez, se encuentra unida de manera no-covalente a filamentos largos de ácido hialurónico. La función principal de los proteoglicanos es la retención de agua. Estos constituyen el 75% del volumen total de la matriz (Jeffrey y Watt, 2003) y el 30% del peso seco del cartílago (McCauley y Disler, 1998).

La composición de la matriz extracelular le confiere propiedades al cartílago articular como: la resistencia, la elasticidad y una superficie de poca fricción, que permiten absorber y distribuir uniformemente la presión sobre el hueso subcondral (McCauley y Disler, 1998). Estas características le permiten al cartílago brindar a la articulación soporte y protección ante el estrés mecánico del movimiento (Heinegard y Oldberg, 1989), funciones que por otra parte, también lo hacen blanco del daño ocasionado por el mal uso de la articulación, el trauma y los procesos inflamatorios. Actualmente, es conocido que la muerte de los condrocitos por apoptosis, es un evento característico en la degeneración del cartílago reumático (Olee *et al.*, 1999) y

osteoartrítico (Sandell y Aigner, 2001) y que además, se incrementa con la edad (Adams y Horton Jr, 1998).

2.2 Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una patología articular degenerativa asociada al sobreuso de la articulación y que se caracteriza por el desgaste progresivo del cartílago. La OA afecta aproximadamente al 6% de la población adulta (Hunter y Felson, 2006) y es más frecuente en individuos de edad media y avanzada (Sandell y Aigner, 2001).

Entre los agentes promotores de la OA se incluyen las citocinas pro-inflamatorias, los leucotrienos y las prostaglandinas. Los niveles de leucotrienos y prostaglandinas se encuentran aumentados en el tejido articular y fluido sinovial de pacientes con OA, donde promueven la inflamación, el dolor y el incremento de citocinas como la IL-1 β , el TNF- α , la IL-17 y la IL-18 secretadas por la membrana sinovial y los condrocitos (Paredes *et al.*, 2002). Estas citocinas estimulan la producción de la MMP-3, la MMP-8 y la MMP-13 y reducen a su vez la expresión de factores inhibidores de MMPs (Sandell y Aigner, 2001), lo que se traduce en la erosión y agrietamiento de la capa superficial del cartílago causado por la degradación de la colágena y los proteoglicanos de la matriz extracelular (Breedveld, 2004). Otros factores como la edad, el sexo y las deficiencias nutricionales incrementan la vulnerabilidad de la articulación a la OA (Hunter y Felson, 2006), y en conjunto con factores mecánicos locales comprometen la integridad estructural de la articulación y favorecen la progresión de la enfermedad.

2.3 Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune degenerativa que cursa con inflamación crónica de las articulaciones y afecta entre el 0.5 y 1% de la población adulta (Gabriel, 2001; Scott, 2007) de la cual, dos de cada tres personas que la padecen son mujeres (Scott, 2007). Sus características principales son la inflamación de la membrana sinovial, y la destrucción del cartílago articular y el hueso subcondral

Si bien no se conoce la etiología de la AR, existen estudios que indican que el sitio inicial del proceso inflamatorio es la membrana sinovial, donde la proliferación de las células que la constituyen (sinoviocitos, fibroblastos y endotelio vascular), en combinación con la infiltración de células inmunocompetentes hacia la cavidad articular, determinan la formación de una masa de tejido inflamatorio altamente irrigada denominada “panus”, que mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias, enzimas proteolíticas, y factores pro-angiogénicos es capaz de invadir y destruir tanto al cartílago como al hueso (Dayer, 2003; Sen, 2005). Asimismo, el desarrollo de esta enfermedad también involucra la producción de elementos como los radicales libres, proteasas lisosomales, autoanticuerpos (particularmente anticuerpos contra inmunoglobulina G y colágeno del cartílago), productos de activación del complemento y complejos inmunes (Kunkel *et al.*, 1996).

2.4 Citocinas pro-inflamatorias y el cartílago articular artrítico

Las citocinas pro-inflamatorias son consideradas los principales mediadores de la inflamación articular, y entre éstas se citan más frecuentemente al TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ (Emery *et al.*, 1987; Karouzakis *et al.*, 2006; Polzer *et al.*, 2007), cuyas concentraciones se incrementan tanto en la circulación, como en la articulación de pacientes con AR (Christodoulou y Choy, 2006). Por ejemplo, el líquido sinovial de pacientes con esta patología contiene concentraciones elevadas de TNF- α , lo que correlaciona positivamente con la inflamación y la erosión ósea (Neidel *et al.*, 1995). En cuanto a la IL-1 β , además de encontrarse concentraciones elevadas en el líquido sinovial de pacientes con OA, que pueden provenir de células inmunocompetentes, también se reporta el incremento de su expresión en el cartílago.

La acción de estas citocinas ha sido evaluada además, en modelos animales. En roedores por ejemplo, la sobre-expresión del TNF- α es suficiente para desencadenar un proceso artrítico con daño en el cartílago articular, erosión ósea (Keffer *et al.*, 1991) y sinovitis (inflamación de la membrana sinovial) (Butler *et al.*, 1997), Asimismo, la IL-1 β también es capaz de promover la erosión ósea artrítica (Dayer, 2003) e incluso, la eliminación genética del antagonista natural de su receptor (IL-1ra) (Horai *et al.*, 2000) potencia el deterioro del cartílago inducido por dicha citocina (Dayer, 2003).

Por otra parte, se ha sugerido que la degradación del cartílago articular inducida por el TNF- α es dependiente de la IL-1 β . Prueba de ello, es que en ratones knock-out para dicha citocina (IL-/-hTNFtg), la sobre-expresión del TNF- α no desencadena la degradación del cartílago aunque si un cuadro inflamatorio (Zwerina *et al.*, 2007). Esto indica que la IL-1 actúa como el principal inductor de daño sobre el cartílago articular bajo condiciones de inflamación. Se ha propuesto que los efectos de estas citocinas sobre la degradación del cartílago son mediados a través del incremento en la producción de enzimas como las MMP, que degradan la matriz extracelular (Goldring, 2000). Si bien la IL-1 β es más potente que el TNF- α para inducir la producción de MMP (Dayer, 2003), ambas citocinas pueden mediar la síntesis y liberación de estas, actuando de manera autócrina y parácrina sobre los condrocitos (Goldring, 2000). Entre las MMP identificadas como responsables de la degradación de las colágenas y proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago se encuentran: la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, y MMP-13 (Burrage *et al.*, 2006).

Además, el TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ pueden inducir daño articular a través de estimular la producción de NO, un gas altamente reactivo capaz de inducir efectos proapoptóticos. En respuesta a cualquiera de estas citocinas, los condrocitos producen altas cantidades de NO (Häuselmann *et al.*, 1998) mediante la expresión de la sintasa inducible de NO (iNOS) (Farrel *et al.*, 1992; Grabowski *et al.*, 1996), por lo que la producción de este radical se incrementa en el interior de las articulaciones reumáticas (Farrel *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1995) (Fig. 2). Cabe mencionar que las citocinas pro-inflamatorias y el NO, además de estimular la secreción de proteasas y suprimir la síntesis de matriz extracelular, pueden promover de manera directa la muerte de los condrocitos por apoptosis (Olee *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002).

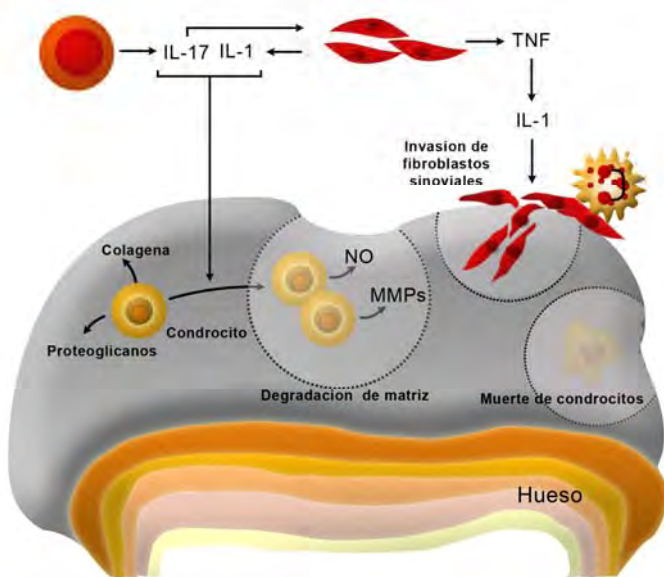


Figura 2. Efectos de las citocinas pro-inflamatorias sobre los condrocitos del cartílago articular en la artritis reumatoide.

El conocimiento de los efectos negativos de las citocinas pro-inflamatorias en la articulación artrítica ha servido de base para la implementación de terapias denominadas genéricamente como terapias anti-citocinas (Breedveld, 1999), las cuales han permitido contrarrestar tanto la sintomatología como la progresión de los padecimientos articulares. El desarrollo de estas terapias ha sido posible gracias al conocimiento de elementos que orquestan dichos padecimiento, siendo los blancos principales el TNF- α y la IL-1 β . Contra el TNF- α , se ha empleado tanto a su receptor soluble de tipo recombinante llamado clínicamente “etanercept”, como al anticuerpo monoclonal para dicha citocina denominado “infiximab”, mientras que para la IL-1 β , se ha utilizado un antagonista recombinante de su receptor denominado “anakinra” (IL-1ra) (Smith y Haynes, 2002). Asimismo, también han sido utilizadas drogas inmunosupresivas como la hidroxiclороquina, el metotrexate, la 6-mercaptopurine, la ciclosporina y la leflunamida que tienen efectos positivos sobre la disminución sintomática de la AR (Smith y Haynes, 2002). Si bien estas terapias permiten mejorar la calidad de vida del paciente con artritis, su uso también desencadena efectos adversos como la inmunosupresión y reacciones sistémicas, incluyendo fiebre, salpullidos e hipotensión (Smith y Haynes, 2002), lo que ha motivado la búsqueda continua de otros factores con posibilidades terapéuticas para la AR.

Si bien ha sido ampliamente documentado que citocinas pro-inflamatorias inducen la muerte de los condrocitos, los mecanismos que subyacen dicho evento aún no han sido bien establecidos. Diversos estudios sugieren que la pérdida de celularidad del cartílago es mediada al

menos en parte, por apoptosis, estableciendo una estrecha correlación entre esta y la degeneración del cartílago en la OA y la AR, por lo que a continuación se revisarán algunos aspectos del proceso apoptótico.

2.5 Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico que se regula finamente a nivel molecular para permitir la eliminación celular selectiva durante el desarrollo y la vida adulta. La alteración de dicha regulación puede resultar en la pérdida o acumulación excesiva de poblaciones celulares.

La apoptosis puede describirse en base a sus dos grandes vías de inicio conocidas como extrínseca e intrínseca, las cuales, son activadas por señales provenientes del exterior o interior celular, respectivamente.

En la vía extrínseca las señales pueden ser ligandos como Fas (FasL) y ligandos de la superfamilia del TNF (Schultz y Harringto, 2003). La vía intrínseca o mitocondrial por su parte, es provocada comúnmente por daños en el ADN, e inicia cuando la mitocondria libera factores apoptogénicos como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), y el complejo SMAC/Diablo (segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína de unión directa a IAP con bajo pI) (Lesauskaite y Ivanoviene, 2002; Schultz y Harringto, 2003). La activación de una o ambas vías dispara los cambios característicos de una célula en apoptosis.

Las células apoptóticas presentan cambios morfológicos y bioquímicos. Los cambios morfológicos involucran la pérdida de contactos intercelulares, la invaginación de la membrana citoplasmática, la condensación de la cromatina, y la posterior fragmentación celular en los llamados cuerpos apoptóticos (Korsmeyer, 1995; Zimmermann y Green, 2001). Los cambios bioquímicos incluyen la fragmentación de ADN en fragmentos oligonucleosomales de alto peso molecular, la externalización de fosfatidilserina (Martin *et al.*, 1995), y la escisión proteolítica de un gran número de substratos (Martin y Green, 1995).

En general, dichos cambios son consecuencia de la ejecución del programa de muerte por apoptosis y en su mayoría, dependen de la activación de un complejo sistema de caspasas. Una familia de proteasas de cisteína (Kühn *et al.*, 2004) generadas como pro-caspasas, y cuya actividad puede ser regulada mediante auto-proteólisis o bien por la proteólisis dependiente de

otras caspasas activas. Las caspasas son divididas en iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras activan a las efectoras, que procesan e inactivan a proteínas importantes para el mantenimiento del citoesqueleto, la reparación del ADN y el control del ciclo celular (Fraser y Evan, 1996; Nagata 1997).

Si bien la activación de caspasas desencadena típicamente la morfología apoptótica, la apoptosis también puede proseguir independientemente a las activación de estas (Dragovich *et al.*, 1998). Ejemplo de ello, es la apoptosis mediada por AIF, un factor capaz de provocar la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, y así, inducir la muerte celular (Otera *et al.*, 2005). De esta manera, los efectos de las caspasas y/o el AIF determinan los cambios morfológicos de las células en apoptosis.

Con base en los mecanismos involucrados en la ejecución de la apoptosis, esta puede ser dividida en tres fases: de iniciación, efectora y de degradación (Kroemer *et al.*, 1997).

Fase de iniciación: en esta fase, dependiendo de la naturaleza del estímulo apoptótico se decide si la apoptosis avanza por la vía intrínseca o extrínseca. Entre los estímulos proapoptóticos más comunes se encuentra la exposición a factores como las citocinas pro-inflamatorias, el NO, las radiaciones, etc, o a condiciones como la hipoxia, la pérdida de interacción célula-matriz extracelular y la disminución de factores de crecimiento.

Uno de los mecanismos mejor conocidos para iniciar el proceso apoptótico mediante la vía extrínseca es el mediado por la familia de receptores a TNF- α , que son conocidos como receptores de muerte y poseen un dominio citosólico DD (Death Domain). Entre los receptores mejor caracterizados como inductores de apoptosis son el TNF- α R, Fas (o CD95), DR3, DR4 y DR5, entre otros (Ashkenazi y Dixit, 1998). Una vez que estos receptores han sido activados por la unión a su ligando, a través de su dominio DD interaccionan con moléculas adaptadoras que además de poseer también un dominio DD, poseen un dominio conocido como DED (Death Efector Domain) o dominio efector de muerte (Berglund *et al.*, 2000). El dominio DED de las proteínas adaptadoras puede interaccionar con caspasas iniciadoras como la 8, 9 y 10 a través del mismo dominio (Muzio *et al.*, 1998). La oligomerización de dichas caspasas con el complejo receptor/proteína adaptadora, induce la auto-degradación del pro-dominio DED de las caspasas, e

induce así su activación. Una vez activadas las caspasas iniciadoras se liberan al citosol donde procesan y activan a las caspasas efectoras (Slee *et al.*, 1999).

En cuanto a la vía intrínseca, uno de los mecanismos más comunes para su detonación es el daño en el ADN. El reconocimiento de dicho daño involucra diversas proteínas. Entre estas se citan PI3K-cinasas como ATM y ATR que actúa como sensores de daño; a cinasas de serina/treonina, fosfatasa y el factor de transcripción p53 que actúan como transductores y efectores de la respuesta a la señal de daño (Wood y Chen, 2007).

En particular, p53 ha sido ampliamente estudiado por considerarse el efector principal que determina si la célula continúa o no su ciclo celular. En respuesta al ADN dañado, p53 es fosforilado y así, se estabiliza, evita su degradación e incrementa su actividad transcripcional. Una vez activo, p53 induce la transcripción de genes como p21Cip/WAF1, un inhibidor de CDK (cinasas dependientes de ciclina) cuya actividad resulta en el arresto del ciclo celular en el punto de control G1/S (Wood y Chen, 2007).

Fase efectora: Pese a la gran variedad de estímulos proapoptóticos, los elementos que orquestan el programa de muerte celular convergen en la fase efectora, donde se determina si la célula entra o no en apoptosis. En la mayoría de los sistemas estudiados, la fase efectora se regula a nivel mitocondrial (Gross *et al.*, 1999) e involucra la expresión de genes pro y antiapoptóticos de la familia Bcl (Lowe y Lin, 2000). Los miembros de dicha familia pueden presentar hasta cuatro dominios conservados, llamados dominios homólogos de Bcl-2 o BH (Bcl-2 homology) (Adams y Cory, 2007). Los que poseen propiedades anti-apoptóticas y promueven la supervivencia celular como el Bcl-2, el Bcl-xL, el Bcl-W, el Mcl-1, A1 y Boo, poseen generalmente los cuatro dominios (BH1 a BH4). En cuanto a los miembros proapoptóticos como Bax, Bak y Bad presentan solo entre 1 y 3 dominios (Adams y Cory, 2007), y regulan negativamente la función mitocondrial al producir la caída del potencial transmembranal y favorecer la liberación de citocromo C.

La activación de p53 inducida por daños en el ADN también desencadena la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, y reprime la de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL (Martin y Elkon, 2004). El desbalance a favor de las proteínas proapoptóticas conlleva a la apertura del poro mitocondrial, la liberación del citocromo C y del factor inductor

de apoptosis (Liu *et al.*, 1996; Daugas *et al.*, 2000). El citocromo C liberado se une a un complejo proteico constituido por la procaspasa 9 y el factor activador de la apoptosis-1 (apaf-1) para formar el apoptosoma. La formación de éste, provoca la autoproteólisis de la procaspasa 9 y así su activación, lo que a su vez, activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 mediante su procesamiento proteolítico (Cain, 2003). El AIF por su parte, se une a proteínas IAP (proteínas inhibitoras de apoptosis) inhibiendo su actividad y permitiendo así el curso de la apoptosis.

Fase de degradación o de manifestación de la apoptosis: esta fase corresponde a la manifestación de los cambios morfológicos de la apoptosis (Kroemer *et al.*, 1997). Entre estos se encuentra: la fragmentación del ADN mediado por DNAsas activadas por caspasas o CADs (caspase-activated deoxyribonuclease) (Enari *et al.*, 1998; Nagata, 2000), la condensación de la cromatina mediada por proteínas como acinus, cuya activación es dependiente de caspasa-3 (Sahara *et al.*, 1999), y el colapso y la invaginación de la membrana celular generado por la proteólisis de proteínas asociadas al citoesqueleto como laminina A, actina, Gas2, Fodrina y Rock-1, y cuyo procesamiento también es dependiente de caspasas y/o otras proteasas (Oberhammer *et al.*, 1994; Janmey, 1998; Sgorbissa *et al.*, 1999; Shi y Wei, 2007).

2.6 Apoptosis en el cartílago

Diversos estudios han establecido una estrecha correlación entre la apoptosis y la degeneración del cartílago en padecimientos como la OA y la AR. En ambas patologías han podido identificarse condrocitos apoptóticos a través de métodos específicos como la inmunotinción de anexina V (proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana celular durante el proceso apoptótico) (Alfaro *et al.*, 2000), TUNEL, ELISA, citometría de flujo (Monfort *et al.*, 2006) y el análisis electroforético del DNA (Mistry *et al.*, 2004). Asimismo, el uso de técnicas bioquímicas y de biología molecular ha hecho posible determinar, al menos en parte, algunos de los elementos que orquestan la apoptosis de los condrocitos en los padecimientos artríticos. Mediante inmunohistoquímica y RT-PCR, se ha detectado en condrocitos la expresión de factores como Bcl-2, Bax, Fas (Mistry *et al.*, 2004), iNOS, y p53 (Hashimoto *et al.*, 2009), implicados en la cascada apoptótica.

Estudios más detallados indican que la apoptosis de los condrocitos inducida por la IL-1 β se acompaña del incremento de especies reactivas de oxígeno y p53, y que el bloqueo específico

de este último, inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por dicha citocina (Csaki *et al.*, 2008). Este resultado sugiere que p53 podría jugar un papel clave en la regulación de la muerte por apoptosis de los condrocitos bajo condiciones de inflamación, y apoya evidencias recientes que indican que su expresión se incrementa significativamente en condrocitos osteoartríticos (Hashimoto *et al.*, 2009).

Asimismo, existen numerosos reportes que indican que en respuesta a citocinas pro-inflamatorias se incrementa la producción de NO por condrocitos. Este radical es capaz de promover la apoptosis de los condrocitos en el cartílago articular (Clancy *et al.*, 2004) tras inducir la activación de p53 (Wang *et al.*, 2007). Estudios previos han sugerido que la acción proapoptótica de p53 en los condrocitos involucra el incremento en el cociente Bax/Bcl-2 y Bax/Bcl-xL que induce la activación de caspasa-3. La caspasa-3 a su vez, es capaz de estimular la activación de DNAsas como CAD, encargadas de mediar la degradación del DNA en fracciones nucleosomales (Nagata, 2000).

En base a estos antecedentes, es razonable pensar que el descubrimiento de factores capaces de inhibir la acción, por lo menos, de alguno de los elementos involucrados en la cascada de muerte celular, pudiera proteger a los condrocitos de las influencias pro-apoptóticas en patologías inflamatorias como la AR. Uno de estos factores podría ser la PRL, ya que diversas evidencias la reportan como una molécula capaz de mediar efectos antiapoptóticos en diversos tipos celulares, y que además, es producida por el cartílago articular.

2.7 La prolactina

La PRL es una hormona peptídica secretada principalmente por lactotropos, células especializadas de la adenohipófisis (Freeman *et al.*, 2000) que comprenden entre un 20-50% del total celular de dicha glándula (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). La PRL posee una masa molecular de 23 kDa en el humano, y su síntesis, además de la adenohipófisis, tiene lugar en numerosos tejidos incluyendo el nervioso, el linfoide, el endotelial vascular, el epitelial mamario y el cartílago (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Corbacho *et al.*, 2002; Macotela *et al.*, 2006). Asimismo, la PRL se encuentra en fluidos biológicos diversos como el suero, el fluido cerebroespinal, el líquido amniótico, las lágrimas, la leche, el sudor, el fluido folicular ovárico (Bole-Feysot *et al.*, 1998) y el líquido sinovial (Ogueta *et al.*, 2002).

La PRL posee una multiplicidad de efectos biológicos relacionados con la reproducción, el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo, el comportamiento, la inmunorregulación, el balance de electrolitos y la angiogénesis (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Corbacho *et al.*, 2002). Dichas acciones involucran efectos de la PRL sobre la proliferación (Olazabal *et al.*, 2000), la diferenciación (Ogueta *et al.*, 2002) y la supervivencia (Tessier *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003; Zermeño *et al.*, 2006) celular. Esta diversidad funcional parece deberse, al menos en parte, a las variantes moleculares que derivan de las modificaciones postraduccionales de la PRL, tales como la glicosilación, la fosforilación y el procesamiento proteolítico (Sinha, 1995), que modifican sus propiedades biológicas (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

El receptor a PRL (RPRL) es miembro de la superfamilia de receptores a citocinas clase 1 (Bole-Feysot *et al.*, 1998), carece de actividad enzimática intrínseca y está constituido por una sola cadena transmembranal (Goffin *et al.*, 2005). Se han identificado tres isoformas que en base a sus diferencias en la extensión del dominio citoplasmático (Bole-Feysot *et al.*, 1998) son definidas como: corta (42 kDa), intermedia (65 kDa) y larga (80 kDa), y corresponden a productos del procesamiento alternativo del transcrito primario (Boutin *et al.*, 1988). Esta heterogeneidad estructural del RPRL también podría contribuir al amplio espectro de acción de la hormona.

La activación del RPRL depende de su dimerización en respuesta a la unión con el ligando. Inicialmente, una molécula de PRL se une a un receptor formando un complejo hormona-receptor inactivo, posterior a esto, a través de un segundo sitio de unión, la hormona se une a un segundo receptor. La dimerización de estos receptores conduce a la activación de una cascada de eventos intracelulares (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Fitzgerald y Dinan, 2008) (Fig. 3).

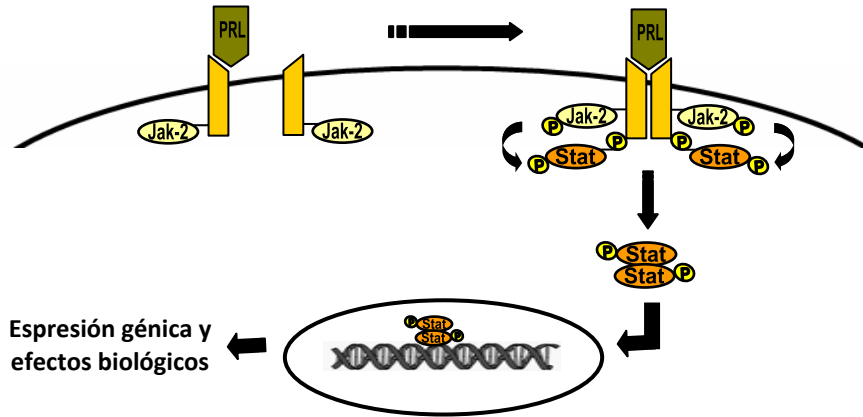


Figura 3. Activación del sistema PRL/RPRL. La activación del RPRL involucra: 1) la unión del ligando a una molécula de receptor, 2) la unión de otra molécula de receptor al mismo ligando, i.e. la dimerización de ambos receptores, y 3) la activación de vías de señalización, *v.gr.*: la vía Jak2/Stat. Jak-2 (Janus cinasa-2)/Stat (transductores y activadores de la transcripción). P, grupo fosfato en residuos de tirosina.

EL RPRL no posee actividad de tirosina cinasa y transduce la señal vía cinasas asociadas (Goffin *et al.*, 2005) que fosforilan y activan a una variedad de proteínas celulares, incluyendo al mismo receptor (Bachelot y Binart, 2007). Diversas cinasas de tirosina y de serina/treonina se asocian al receptor de PRL incluyendo: Jak-2 (Janus cinasa-2), MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), y Src cinasa (cinasa de tirosina relacionada con la oncoproteína del virus de sarcoma de Rous) que desencadenan cascadas específicas de señalización (Goffin *et al.*, 2005) (Fig. 4).

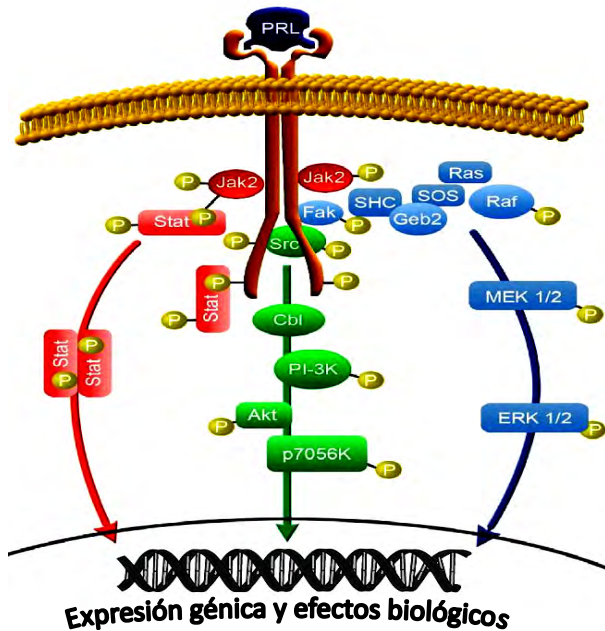


Figura 4. Vías clásicas de señalización activadas por PRL a través de la isoforma larga de su receptor. Se muestra en rojo la vía de señalización Jak2/Stat, en verde la vía PI-3K/Akt, y en azul la vía de las MAPK. (Tomado y modificado a partir de Goffin *et al.*, 2005). Jak2 (Janus cinasa-2); Stat (transductores y activadores de la transcripción), PI-3K (fosfatidilinositol-3 cinasa); MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno).

Si bien los efectos de la PRL pueden ser mediados a través de diferentes vías de señalización (Fig. 3 y 4), la vía clásica que media las acciones de la hormona en la mayoría de sus células blanco involucra la activación de Jak-2 y la fosforilación/activación de factores de transcripción de la familia Stat (transductores y activadores de la transcripción) (Freeman *et al.*, 2000; Goffin *et al.*, 2005; Fitzgerald y Dinan, 2008). Cada molécula del RPRL se encuentra acoplada a una molécula de Jak-2 (Yu-Lee, 2002), cuya activación depende de la dimerización del RPRL ya mencionada. Una vez dimerizados los receptores, las Jak-2 acopladas a estos, sufren una transfosforilación que las activa, permitiéndoles fosforilar residuos de tirosina tanto del RPRL como de los factores de transcripción stat (Goffin *et al.*, 1999). Una vez fosforilados, los stat forman dímeros que se translocan al núcleo, se unen a secuencias consenso en el DNA denominadas GAS (interferon- γ activation sequence), y activan la transcripción génica (Bole-Feysot *et al.*, 1998) (Fig. 3 y 4).

En cuanto a los efectos mediados por la señalización de PRL, se encuentra la promoción de la supervivencia celular. Se ha propuesto que la PRL puede inhibir la apoptosis de células del epitelio mamario (Humphreys y Hennighausen, 1999), de la decidua uterina (Tessier *et al.*, 2001) y de células inmunes como los linfocitos T (Krishnan *et al.*, 2003), etc. Estas acciones involucran la activación de la isoforma larga de su receptor, y la consecuente activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K) que a su vez, fosforila/activa a la cinasa de serina/treonina (Akt) (Tessier *et al.*, 2001). Esta señalización intracelular se ha asociado con la expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y XIAP) y con la inhibición de la expresión y activación de la caspasa-3 (Tessier *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003).

Si bien son múltiples los factores que pueden influenciar la diversidad funcional de la PRL, la heterogeneidad molecular de la hormona podría ser de gran relevancia. Dicha observación puede ser sustentada al estudiar la funcionalidad de los fragmentos que resultan de su modificación proteolítica, las vaso inhibinas.

2.8 Vaso inhibinas

Las vaso inhibinas (Vi) constituyen una familia de péptidos derivados de la PRL, la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario, corresponden a la región amino terminal de dichas hormonas y son generadas por la acción proteolítica de enzimas como las metaloproteasas de

matriz (Macotella *et al.*, 2006), la cathepsina-D (Baldocchi *et al.*, 1993; Piwnica *et al.*, 2004) y la proteína morfogénica de hueso-1 (BMP-1) (Ge *et al.*, 2007). Las Vi están presentes en la circulación (Torner *et al.*, 1995) y son producidas tanto en la adenohipófisis (Cruz-Soto *et al.*, 2009) como en sitios extrahipofisarios que incluyen al endotelio vascular (Corbacho *et al.*, 2000), el hipotálamo (Clapp *et al.*, 1994), la retina (Aranda *et al.*, 2005) y el cartílago (Macotella *et al.*, 2006).

El nombre vasoinhibinas, deriva de sus efectos inhibitorios sobre la función vascular. Las Vi inhiben el crecimiento y la migración de las células endoteliales en respuesta a factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y la IL-1 β (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2007). Además, las Vi estimulan la regresión de los vasos sanguíneos mediante su apoptosis (Martini *et al.*, 2000) e inhiben la dilatación y la permeabilidad vascular (Clapp *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2008). Estas acciones ejercidas directamente sobre el endotelio vascular se traducen en la inhibición de la vascularización, la vasopermeabilidad (Dueñas *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2005; García *et al.*, 2008) y la angiogénesis (Pan *et al.*, 2004) que tiene lugar en tejidos como la retina y diferentes tipos de tumores, y que además, son claves en procesos como el crecimiento y la metástasis (Kim *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2007).

Si bien se ha descrito la presencia de sitios de unión específicos para vasoinhibinas en las membranas de células endoteliales (Clapp y Weiner, 1992), aún se desconoce la naturaleza de estos posibles receptores. No obstante, actualmente se cuenta con información acerca de los mecanismos de su señalización. Por ejemplo, se conoce que las vasoinhibinas detienen el ciclo celular endotelial en G₀ y G₂ a través de inhibir a las ciclinas D1 y B1, y estimular a los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas p21(cip1) y p27(kip1) (Tabruyn *et al.*, 2005). Estas acciones involucran la inhibición de la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) a nivel de Ras (D'Angelo *et al.*, 1995; D'Angelo *et al.*, 1999) y de las vías proliferativas dependientes de la sintasa del NO endotelial (eNOS) (Gonzalez *et al.*, 2004). Asimismo, las Vi bloquean la vasodilatación y la vasopermeabilidad interfiriendo con la activación de la eNOS, y dicha inhibición, involucra la activación de la proteína fosfatasa 2A que desfosforila e inactiva a dicha enzima (Garcia *et al.*, 2008). Además, las Vi son capaces de inducir la apoptosis de células endoteliales activando a la proteína pro-apoptótica Bcl-X_S

(Martini *et al.*, 2000), y las caspasas 8 y 9 vía el factor de transcripción NF- κ B (Tabruyn *et al.*, 2003).

2.9 Efectos opuestos de la prolactina y las vasoinhibinas

A diferencia de las vasoinhibinas, la PRL promueve la angiogénesis. Estudios *in vivo* muestran un papel facilitador de la PRL sobre la proliferación de las células endoteliales del cuerpo lúteo (Gaytan *et al.*, 1997), el testículo (Ko *et al.*, 2003) y el miocardio (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Además, tanto la delección génica del receptor de PRL (Grosdemouge *et al.*, 2003), como la supresión farmacológica de la secreción de la hormona mediante bromocriptina (Chen *et al.*, 2002) interfieren con la vascularización del cuerpo lúteo. Asimismo, se sabe que el crecimiento y desarrollo de las mamas durante el embarazo están sujetos a una correcta neovascularización (Clapp *et al.*, 2008) y que estos procesos se ven alterados en modelos de ratones que carecen de la expresión del gen de la PRL o del receptor para ésta (Horseman *et al.*, 1997; Ormandy *et al.*, 1997). También existen reportes de la actividad estimuladora y pro-angiogénica de la PRL sobre la proliferación de células endoteliales y la formación de capilares *in vitro* (Malaguarnera *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de este tipo de experimentos *in vitro* con células endoteliales no muestran evidencias de que la PRL tenga efectos mitogénicos (Clapp *et al.*, 2008), y es posible que el efecto pro-angiogénico de la PRL sea indirecto y requiera de moléculas intermediarias. La PRL induce la síntesis de factores pro-angiogénicos como el bFGF y el VEGF en células de la decidua (Srivastava *et al.*, 1998), del epitelio mamario y del sistema inmune (Goldhar *et al.*, 2005).

El hecho de que la PRL y las vasoinhibinas posean efectos opuestos sobre los vasos sanguíneos pone de manifiesto un mecanismo fino de regulación funcional; en el cual, el resultado final de los efectos hormonales podría estar supeditado tanto a la actividad de proteasas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL, como a las condiciones microambientales donde la PRL ejerce sus efectos. La inflamación es un ejemplo en el que estas condiciones pueden ser relevantes, de hecho, existen evidencias de que la PRL y las vasoinhibinas pueden ejercer efectos inflamatorios opuestos. Se ha mostrado que en fibroblastos de pulmón la PRL y las vasoinhibinas ejercen efectos anti-inflamatorios y pro-inflamatorios, respectivamente. La PRL inhibe la expresión de la iNOS y la consecuente producción de NO inducida por la combinación de TNF- α , IL-1 β , e IFN- γ (Corbacho *et al.*, 2003), mientras que las Vi inducen la

expresión de la iNOS y la producción de NO con una potencia similar a la combinación de éstas tres citocinas (Corbacho *et al.*, 2000). El NO producido por la actividad de la iNOS se considera un mediador de la inflamación, y el altas concentraciones, ejerce efectos antimicrobianos y destructores del tejido local vía la generación de radicales libres. Éstos últimos conducen a la oxidación e inactivación de enzimas, mutaciones en el ADN, y provocan la desintegración de la membrana plasmática, etc (Eiserich *et al.*, 1998). De hecho la inducción de apoptosis es una derivación de los efectos del NO sobre distintos tipos celulares (Bao *et al.*, 2007).

Finalmente, se conoce que la PRL y las vasoinhibinas pueden ejercer efectos opuestos en la regulación de las respuestas neuroendócrinas y conductuales al estrés. La PRL inhibe la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la conducta de ansiedad en respuesta a diversos estresores (Torner *et al.*, 2001; Zamorano, 2006), mientras que las vasoinhibinas por su parte, pueden antagonizar dichas acciones. Estudios recientes de nuestro laboratorio, muestran que las vasoinhibinas se incrementan en el hipotálamo a consecuencia de la exposición a 30 minutos de estrés por inmovilización (Zamorano *et al.*, 2008), y que la administración intracerebroventricular de vasoinhibinas promueve la conducta de ansiedad (Zamorano *et al.*, 2008).

De interés para esta tesis son las evidencias que sugieren que acciones opuestas de la PRL y las vasoinhibinas podrían participar en la regulación de la supervivencia del cartílago articular.

2.10 Prolactina, vasoinhibinas y condrocitos

La PRL se ha asociado con la diferenciación del cartílago durante el desarrollo. El RPRL se expresa en los condrocitos fetales (Tzeng y Linzer, 1997; Freemark *et al.*, 1997) y se ha mostrado que la PRL es producida por células madre derivadas de médula ósea cuando son inducidas a diferenciarse a condrocitos, donde además de estimular su propia expresión, induce la producción de colágena II y proteoglicanos (Ogueta *et al.*, 2002). Además, en combinación con glucocorticoides, la PRL induce la organización de los condrocitos en columnas longitudinales (Ogueta *et al.*, 2002).

La PRL también puede actuar sobre el cartílago adulto. El ARN mensajero (ARNm) del RPRL se ha identificado en condrocitos de la articulación femoro-tibial de ratas adultas

(Zermeño *et al.*, 2006) y en el cartílago de pacientes con OA (Ogueta *et al.*, 2002). Si bien se han reportado niveles altos de PRL en el suero (Mateo *et al.*, 1998; Seriola *et al.*, 2002) y en el líquido sinovial (Nagafuchi *et al.*, 1999; Ogueta *et al.*, 2002) de pacientes con AR y sinovitis (Ogueta *et al.*, 2002) que sugieren un posible efecto de la PRL circulante bajo condiciones de inflamación, la PRL también puede funcionar como regulador local del cartílago. Los condrocitos articulares de ratas normales expresan el ARN mensajero de la PRL y lo procesan a proteína, y ésta a su vez, hacia vasoinhibinas (Macotella *et al.*, 2006). Además, la prolactina también es producida por células sinoviales y células inmunes infiltradas en la articulación artrítica, en las cuales induce la producción de interleucina-6, interleucina-8 y MMP-3, e inhibe la producción del inhibidor de MMP tipo 1 (TIMP-1) (Nagafuchi *et al.*, 1999).

Lo anterior abre la posibilidad de que la PRL regule la supervivencia de los condrocitos. Mas directamente, trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que la PRL inhibe la apoptosis de condrocitos en cultivo inducida por restricción de suero y evaluada por tres diferentes metodologías (TUNEL, ELISA y citometría de flujo) (Zermeño *et al.*, 2006). Más aún, en experimentos *in vivo* se observó que la inyección intra-articular del TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ induce la apoptosis de los condrocitos articulares en ratas y que este efecto se bloquea por acción de la PRL coinyectada con dichas citocinas (Guzmán-Morales, 2008). De hecho, con la finalidad de demostrar la participación de la PRL endógena en el mantenimiento de la supervivencia de los condrocitos, se evaluó la presencia de apoptosis en el cartílago articular de ratones knock-out para el RPRL (Adán, 2008). La ausencia de diferencias bajo condiciones normales sugirió que la acción de la PRL no es indispensable para la supervivencia de este tipo celular. Sin embargo, cuando se retó al sistema a través de inducir la apoptosis en el cartílago mediante la inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias, los animales knock-out para el RPRL mostraron una respuesta mayor en términos de apoptosis, que los ratones silvestres (Adán, 2008). Estos hallazgos sugieren que la PRL endógena puede proteger al cartílago bajo condiciones de inflamación y por ende, que la PRL pudiera tener un valor terapéutico potencial.

Con respecto a las vasoinhibinas, es de interés investigar su posible contribución a la regulación de la supervivencia del cartílago articular, dado a que los condrocitos producen la maquinaria enzimática para generar vasoinhibinas a partir de PRL (Macotella *et al.*, 2006), y que las citocinas pro-inflamatorias estimulan la actividad de enzimas proteolíticas como las MMP

capaces de generarlas (Goldring, 2000; Sandell y Aigner, 2001; Macotella *et al.*, 2006). Además, por que en un estudio preliminar de nuestro laboratorio se encontró que las vasoinhibinas pueden ejercer efectos proapoptóticos sobre condrocitos en cultivo, hecho que de confirmarse, proporcionaría una evidencia de que los efectos de la PRL resultan de la regulación de la actividad de proteasas en el microambiente del órgano blanco capaces de metabolizarla a vasoinhibinas.

3. JUSTIFICACIÓN

La PRL es capaz de proteger al cartílago frente al efecto proapoptótico de las citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, se desconoce si este efecto involucra la acción directa de la PRL sobre los condrocitos, el mecanismo responsable de dicha acción protectora, y si esta acción es influida por el procesamiento proteolítico de la hormona hacia vasoinhibinas. De modo que en esta tesis exploramos estas tres interrogantes teniendo como base las siguientes hipótesis.

4. HIPÓTESIS

1. La PRL actúa directamente sobre los condrocitos inhibiendo la apoptosis inducida por la combinación de TNF- α , IL-1 β , e IFN- γ y este mecanismo involucra la inhibición de la producción de NO inducida por dichas citocinas.
2. Las vasoinhibinas estimulan la apoptosis de los condrocitos a través de un mecanismo que involucra la producción de NO.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos generales

1. Analizar el efecto de la PRL, las vasoinhibinas y las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo.

2. Evaluar si la producción de NO por condrocitos se ve modificada por la PRL, las vasoinhibinas y las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , e IFN- γ .

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la PRL sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo inducida por la mezcla de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , e IFN- γ .
 - a) Evaluar apoptosis
 - b) Determinar la expresión de p53
 - c) Valorar la producción de NO
2. Determinar el efecto de las vasoinhibinas sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo.
 - a) Evaluar apoptosis
 - b) Valorar la producción de NO

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Prolactina, vasoinhibinas, citocinas e inhibidores. La PRL fue adquirida del “Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis” de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NHPP, NIH, Torrance, CA). Las vasoinhibinas humanas recombinantes (rhVi) fueron obtenidas por mutagénesis dirigida a partir del DNA complementario de PRL humana (Galfione *et al.*, 2003). Las citocinas recombinantes de humano TNF- α , IL-1 β e IFN- γ fueron adquiridas de R&D System Inc. (Mineapolis, MN, EUA) y utilizadas a las concentraciones que se indican en la tabla 1. El L-NAME (*N* ω -nitro-l-arginine methyl ester), usado como inhibidor no específico de las sintetasas de óxido nítrico fue adquirido de Sigma Aldrich.

Tabla 1.	Citocinas pro-inflamatorias (ng/ml)		
	IL-1 β	IFN- γ	TNF- α
cit1 (combinación 1)	10	10	25
cit2 (combinación 2)	10	20	12.5
cit3 (combinación 3)	20	20	12.5

6.2 Métodos

Aislamiento y cultivo de condrocitos. El cartílago fue aislado de los cóndilos femorales y de la superficie de las placas tibiales de ratas Wistar machos de 130-150 g de peso. El cartílago fue cortado en fragmentos pequeños y digerido con 0.025% de tripsina en solución A (1.8g glucosa, 0.22g KCl, 7.59g NaCl y 0.745g Na₂HPO₄, en un L de agua; pH 7.3-7.4) durante 10 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación. Posteriormente, el tejido digerido fue centrifugado a 1200 rpm durante 10 min. La pastilla obtenida fue incubada con 0.02% de colagenasa tipo II también en solución A durante 2 horas a 37°C y en agitación. Los agregados celulares o fragmentos de tejido no digerido fueron eliminados por filtración y la suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Las células obtenidas se sembraron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y cultivadas a 37° C bajo una atmósfera de 95% aire - 5% de CO₂.

Evaluación de la apoptosis de condrocitos *in vitro*. Los condrocitos fueron sembrados en medio DMEM con 10% SFB a una densidad de 2×10^5 células/pozo (placa de 48 pozos) durante 24 h. Posteriormente, las células se incubaron con las mezclas de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) indicadas en la tabla 1, en presencia o ausencia de PRL (100 nM) o el inhibidor de las sintetasas del NO, L-NAME (1 mM). En otros experimentos los condrocitos se incubaron con la combinación 1 de citocinas (cit1) en presencia de concentraciones crecientes de PRL (12.5, 25, 50 y 100 nM). Asimismo, para evaluar el efecto de las Vi en la supervivencia de los condrocitos, estos fueron incubados con diferentes concentraciones de Vi (0.1, 1.0 y 10 nM). Después de 24 h de incubación con el tratamiento respectivo, se colectó el medio junto con los condrocitos adheridos al pozo, y fueron centrifugados. El medio ya sin la presencia celular fue congelado a -70°C para la deteminación de NO. El paquete celular fue lisado con un buffer de lisis proveído en el estuche para evaluar apoptosis por ELISA. Los lisados fueron congelados a -70°C para el análisis posterior de apoptosis.

Detección de muerte celular por el ensayo de ELISA. La apoptosis fue cuantificada mediante un inmunoensayo enzimático (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) diseñado para cuantificar el ADN fragmentado asociado a histonas (fragmentos nucleosomales). El ensayo fue realizado siguiendo las instrucciones del proveedor con la placa (96 pozos) y los reactivos

proveídos en el estuche. Inicialmente se colocaron 50 μl /pozo de la solución de cubrimiento (anticuerpo anti-histona para reconocer a las histonas que quedan descubiertas debido a la degradación del ADN) durante 1 h a temperatura ambiente. La solución fue retirada por succión mediante un sistema de vacío y en su lugar se colocaron 100 μl /pozo del buffer de incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el buffer de incubación se sustituyó por 50 μl del lisado celular diluído previamente 1:10 con el mismo buffer. Dichos lisados fueron incubados por 90 min a temperatura ambiente. Para determinar el ruido del fondo, en lugar del lisado se colocaron 50 μl /pozo de buffer de incubación por duplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados tres veces con solución de lavado y se agregaron 50 μl de anti-DNA/pozo incubando durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los pozos fueron lavados tres veces con solución de lavado y se colocaron 50 μl de sustrato/pozo incubándose en agitación a 250 rpm hasta observar color (15 minutos). La densidad óptica fue determinada a una $\lambda = 405$ nm, y como referencia se utilizó una $\lambda = 490$ nm contra la solución del sustrato.

Análisis de la producción de NO mediante la reacción de Griess. Se analizaron los efectos tanto de vasoinhibinas, PRL y citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) sobre la producción de NO en condrocitos cultivados. La producción de NO fue determinada en los medios condicionados por los condrocitos incubados con dichos tratamientos. Para este fin se utilizó la reacción de Griess que mide las concentraciones de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3) correspondientes a los productos estables de la oxidación del NO. Dicha reacción fue realizada en base al método utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio (Corbacho *et al.*, 2000). De acuerdo a este método, se elaboró una curva de calibración de NO_3 (0-200 μM) en medio DMEM con 10% de SFB. Se preparó una solución “stock” (50% HEPES pH 7.5, 25% formato de amonio (FA) 2.4M pH 7.2, y 25% de agua destilada) y se agregaron 50 μl de reductasa de *Escherichia coli* por cada 2 ml de la solución stock. Se utilizaron 100 μl de cada uno de los medios condicionado por condrocitos o de la curva de NO_3 para ser mezclados con 100 μl de la solución stock y se incubaron durante 1h a 37°C para posteriormente centrifugarlos por 3 min a 13,000 rpm. Se colocaron 100 μl de cada sobrenadante en una placa de 96 pozos, y se les adicionó 100 μl del reactivo de Griess (1% Sulfanilamida, 0.1% NEDA, 3% de ácido fosfórico, en agua destilada). Finalmente se evaluó la densidad óptica a una $\lambda = 490\text{nm}$.

PCR en tiempo real. El RNA de los condrocitos se extrajo usando el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se retrotranscribieron 5 µg de RNA total utilizando el enzima retrotranscriptasa MMLV (Moloney murine leukemia virus) (Promega Madison, USA). Posterior a la retrotranscripción, alícuotas de 2 µl de DNA complementario fueron usadas como molde para la amplificación del cDNA por PCR tiempo real usando un equipo LightCycler™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN., USA) y el reactivo SYBR green (Epicentre Technologies, Madison, WI., USA). Para la amplificación de p53 se utilizaron los oligonucleóticos de secuencia específica: sentido 5'AGA GAC CCA GCA ACT ACC AAC C3' y antisentido 5'CTC AGA CTG ACA GCC TCT GCA T3' que generan un producto de 216 pb. La reacción incluyó un primer ciclo de 1 minuto a 95°C y 50 ciclos de amplificación (0 seg a 94°C, 8 seg a 62°C, y 9 seg a 72°C) con detección fluorescente al final de cada ciclo.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la PRL sobre la apoptosis de los condrocitos inducida por citocinas pro-inflamatorias

Para evaluar el efecto en la apoptosis de los condrocitos en cultivo, fueron probadas tres combinaciones de citocinas pro-inflamatorias (Tabla 1). Las mezclas de citocinas 1 y 2 estimularon significativamente la apoptosis de los condrocitos en cultivo, mientras que la mezcla 3 no tuvo efecto. La PRL a una concentración de 100 nM inhibió significativamente la apoptosis de los condrocitos inducida por las mezclas de citocinas 1 y 2, sin modificar la apoptosis observada en ausencia de éstas (Fig. 5).

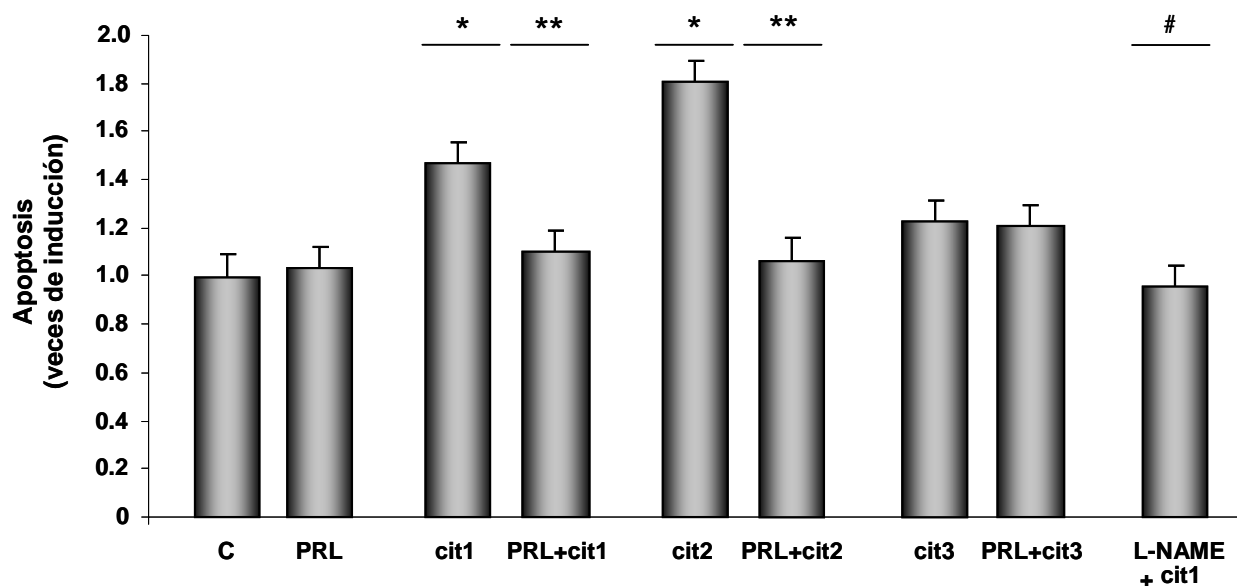


Figura 5.- Análisis cuantitativo por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con tres combinaciones de citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2, cit3) en presencia o ausencia de PRL (100 nM) o L-NAME (1 mM). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes, e indican los promedios \pm E.E de las determinaciones por triplicado de dicho experimento. El. * $p < 0.05$ vs C (control), ** $p < 0.05$ vs la mezcla de citocinas correspondiente, # $p < 0.05$ vs cit1.

Cuando se determinó el efecto de dosis crecientes de PRL contra la mezcla 1 de las citocinas se observó que todas las dosis de PRL inhibieron de forma similar el efecto proapoptótico de dichas citocinas (Fig. 6).

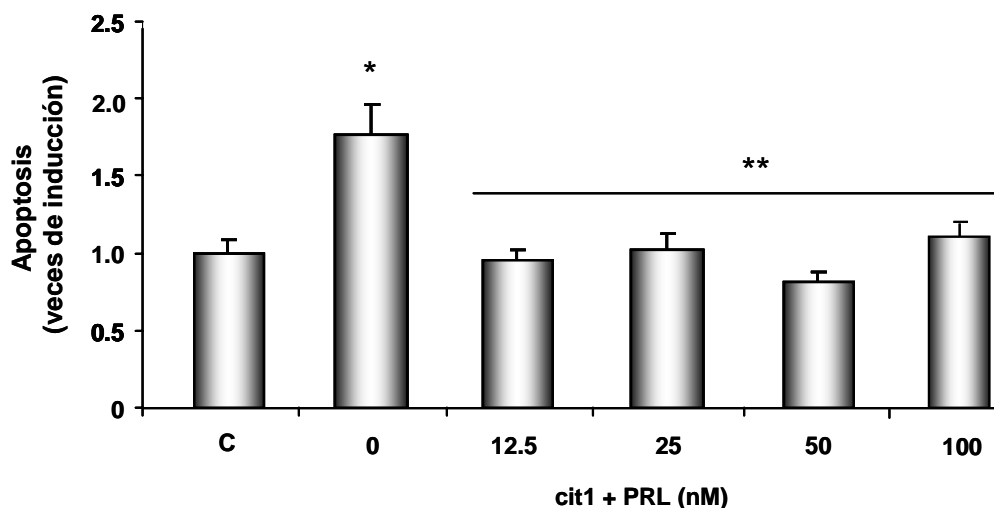


Figura 6. Análisis cuantitativo por elisa ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (cit1) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de PRL (12.5, 25, 50 y 100 nM). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes, e indican los promedios \pm E.E de las determinaciones por triplicado de dicho experimento. * $p < 0.05$ vs C (control), ** $p < 0.05$ vs 0 (cit1 sin PRL).

Para apoyar el efecto antiapoptótico de la PRL en condrocitos evaluamos la expresión del ARNm de p53. Además, por que diversos estudios indican que su expresión puede ser incrementada en condrocitos cultivados como una respuesta a estímulos proapoptóticos como las citocinas pro-inflamatorias (Csaki *et al.*, 2008), el NO (Pelletier *et al.*, 1998), toxinas como la T-2 (Chen *et al.*, 2008), y la tensión por esqueleto¹ (Csaki *et al.*, 2008). Asimismo, la sobreexpresión de p53 ha sido correlacionada con la destrucción del cartílago de pacientes con AR y OA (Yatsugi *et al.*, 2000). Entre los mecanismos mediante los cuales p53 estimula la apoptosis de los condrocitos está la inducción de la caspasa-3 (Csaki *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008), el incremento del cociente Bax/Bcl-2 y Bax/Bcl-X_L (Chen *et al.*, 2008).

De manera consistente con los antecedentes que apoyan la participación de p53 en la apoptosis de condrocitos en cultivo, en esta tesis mostramos mediante análisis por RT-PCR en tiempo real que la mezcla de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (cit1) induce la expresión de p53 en este tipo celular (Fig. 7). Además, de acuerdo con los efectos antiapoptóticos de la PRL, se observó que

¹ **Tensión por esqueleto**; se refiere a la aplicación de una fuerza en dirección perpendicular a una estructura blanco. En este caso particular, explantes de cartílago articular.

esta hormona disminuye de manera significativa el aumento de la expresión de p53 inducido por dichas citocinas (Fig. 7).

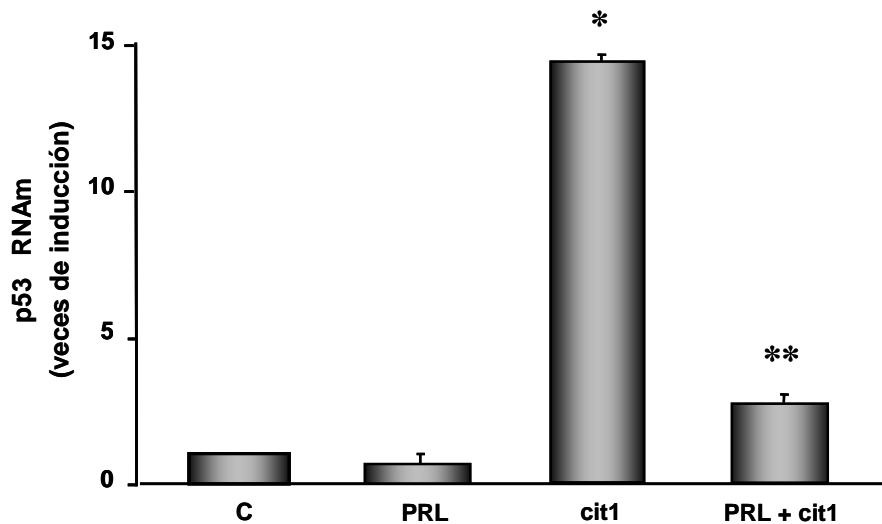


Figura 7. Análisis de la expresión del ARNm de p53 por RT-PCR en tiempo real en condrocitos cultivados durante 24 h con o sin citocinas pro-inflamatorias (cit1) en presencia o ausencia de PRL (100 nM). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes, e indican los promedios \pm E.E de las determinaciones por triplicado de dicho experimento. * $p < 0.05$ vs C (control), ** $p < 0.05$ vs cit1.

7.2 Efecto de las citocinas pro-inflamatorias y de la PRL sobre la producción de NO

En apoyo a que el efecto proapoptótico de las citocinas pro-inflamatorias es mediado a través de la producción de NO, encontramos que el L-NAME, un inhibidor no selectivo de las sintasas del óxido nítrico (NOS), inhibe de manera significativa la apoptosis de los condrocitos (Fig 5). Esto condujo a investigar si el mecanismo inhibitorio de la PRL sobre la apoptosis de los condrocitos inducida por las citocinas pro-inflamatorias involucra la disminución en la producción de NO. Con este propósito, mediante la reacción de Griess evaluamos la producción de NO a través de medir los productos estables de su oxidación (NO_2 ; nitritos y NO_3 ; nitratos) en los medios condicionados de condrocitos incubados con las tres combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de PRL. Encontramos que las tres combinaciones de citocinas estimulan significativamente (50 a 60 veces) la producción de dichos metabolitos (NO_2 y NO_3) y que este aumento no se altera en presencia de PRL, pero si se reduce en presencia de L-NAME (Fig. 8). Estos hallazgos sugieren que la PRL protege a los condrocitos de la apoptosis inducida por citocinas pro-inflamatorias a través de un mecanismo independiente de la producción de NO.

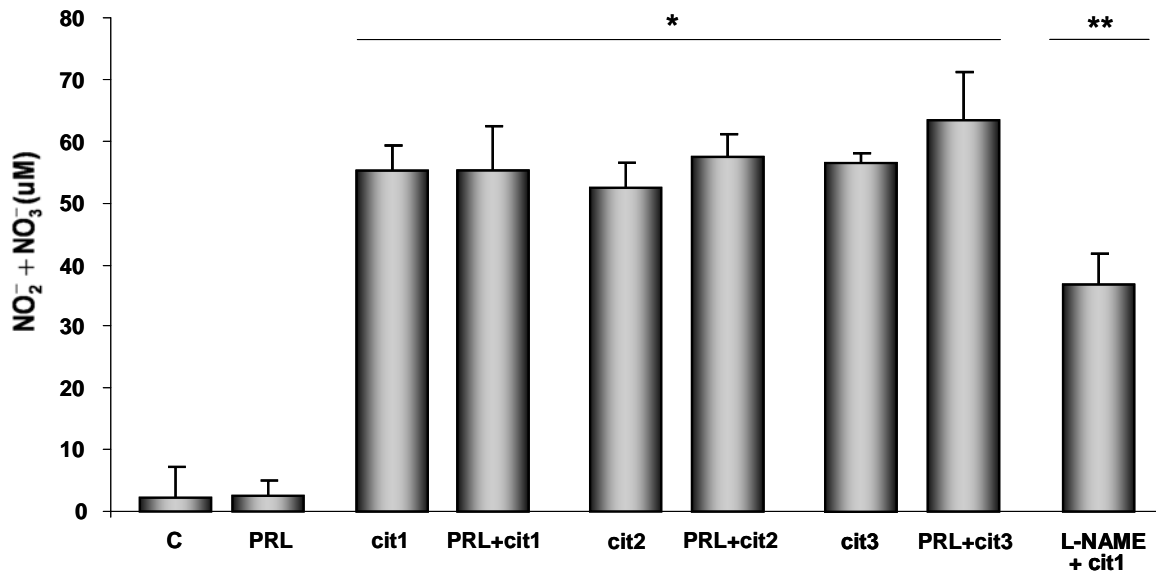


Figura 8.- Análisis cuantitativo de los metabolitos estables de la oxidación del NO mediante la reacción de Griess. La gráfica indica la producción de NO en μM de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) producidos por condrocitos cultivados durante 24 h bajo la estimulación de citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2 y cit3) en presencia o ausencia de PRL (100 nM) o L-NAME (1 mM). Los resultados corresponden a los promedios \pm E.E de tres réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs C (control), ** $P < 0.05$ vs cit1.

7.3 Efecto de las vaso inhibinas sobre la apoptosis de los condrocitos

La incubación de condrocitos con vaso inhibinas durante 24 h resultó en el incremento de su apoptosis de manera dependiente de la dosis (Fig. 9). Para determinar si el efecto proapoptótico de las vaso inhibinas pudiera involucrar al NO, se evaluó la producción de NO en respuesta a la mayor concentración de vaso inhibinas (10 nM) y se le comparó con la de una dosis de PRL (100 nM) y de las tres combinaciones de citocinas pro-inflamatorias (Fig. 10). Se observó que si bien las vaso inhibinas inducen de manera significativa la apoptosis de los condrocitos (Fig. 9), no modifican la producción basal de NO (Fig. 10), sugiriendo que el mecanismo por el cual ejercen su acción proapoptótica no involucra la producción de este radical y por lo tanto que difieren del mecanismo usado por las citocinas pro-inflamatorias.

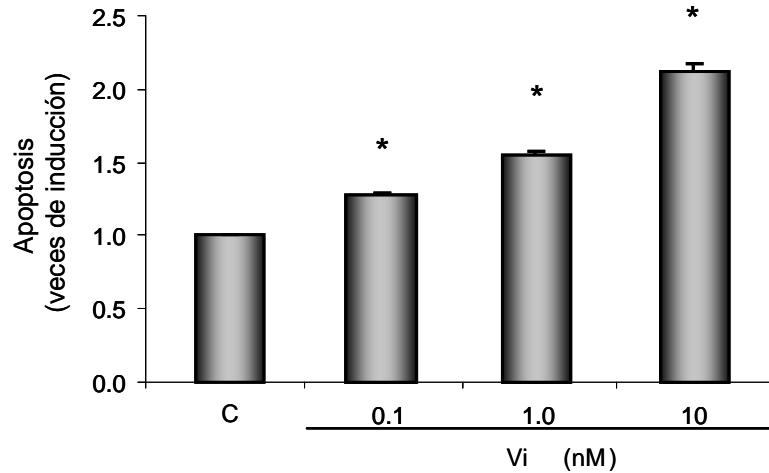


Figura 9. Análisis cuantitativo por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con dosis crecientes de vasoinhibinas (0.1, 1.0 y 10 nM). Los resultados son promedios \pm E.E. de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs C (control).

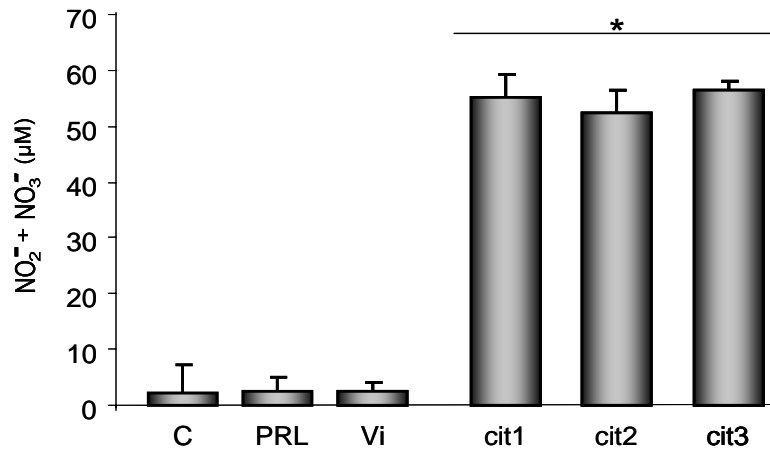


Figura 10. Análisis cuantitativo de los metabolitos estables de la oxidación del NO mediante la reacción de Griess. La gráfica indica la producción de NO en μM de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) producidos por condrocitos cultivados en presencia de PRL (100 nM), Vi (10 nM) y citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2 y cit3) durante 24 h. Los resultados corresponden a los promedios \pm E.E. de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs C (control), PRL y Vi.

8. DISCUSIÓN

El cartílago es un tejido especializado en brindar soporte al cuerpo y lo protege de la presión que genera la ejecución de un movimiento. Los condrocitos constituyen su único tipo celular y de la supervivencia de estos depende la integridad de dicho tejido. La muerte por apoptosis de los condrocitos es un evento involucrado en procesos fisiológicos como el crecimiento, donde de manera finamente regulada su muerte es inducida para sustituir al cartílago por hueso. Asimismo, la muerte de los condrocitos también se presenta bajo condiciones patológicas, entre las cuales, sobresalen los padecimientos artríticos como la AR y la OA. En ambas patologías la destrucción del cartílago articular se ha relacionado con la inflamación del tejido sinovial y la apoptosis de los condrocitos (Yatsugi *et al.*, 2000; Kühn *et al.*, 2004; Karouzakis *et al.*, 2006). La interrelación entre los procesos inflamatorios y la destrucción del cartílago tiene como principales mediadores a las citocinas pro-inflamatorias, específicamente al TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ , que además de estimular la producción de proteasas como las MMPs que digieren la matrix extracelular del cartílago, promueven la apoptosis de los condrocitos. En este trabajo de tesis, demostramos que la combinación de dichas citocinas inducen la muerte por apoptosis de los condrocitos en cultivo, y que la PRL y sus metabolitos, las vasoinhibinas, pueden respectivamente, inhibir o favorecer dicha acción.

Diversos trabajos reportan el incremento en la concentración de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en el suero y en la articulación de pacientes con AR (Koch *et al.*, 1995; Bucht *et al.*, 2007). Mas aún, el uso de terapias anticitocinas que tienen como blanco específico a la IL-1 β y al TNF- α ha permitido reducir la progresión de la AR (Smith y Haynes, 2002) y la muerte por apoptosis de los condrocitos (Marvin y Hubert, 2004). Son múltiples las evidencias que señalan el papel protagónico de las citocinas pro-inflamatorias sobre la destrucción del cartílago articular en las artropatías. Asimismo, se han explorado ampliamente los efectos proapoptóticos directos de estas proteínas sobre los condrocitos e incluso existen resultados contradictorios. Por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado ausencia de efecto del TNF- α e IL-1 β , posiblemente por que sus acciones individuales no son suficientes para afectar la supervivencia de los condrocitos en cultivo, ya que esta a su vez, está influenciada positivamente por factores de crecimiento y otras hormonas presentes en dicho medio. En otros trabajos tampoco encontraron apoptosis en condrocitos incubados con IL-1 β o TNF- α a menos de co-incubar a dichas citocinas en presencia de otros

factores proapoptóticos como Ro31-8220 (un inhibidor de la fosfatasa de proteínas activadas por mitógeno-1) y la actinomicina D (capaz de activar caspasas y sensibilizar a la apoptosis a diversos tipos celulares) (López-Armada *et al.*, 2006; Caramés *et al.*, 2008).

De manera interesante, en los estudios previos no ha sido utilizada la combinación de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . En este trabajo mostramos por primera vez que su combinación promueve la apoptosis de los condrocitos en cultivo evaluada mediante el análisis cuantitativo del DNA fragmentado a través de ELISA. En apoyo al efecto proapoptótico de estas citocinas, encontramos que inducen la expresión de p53, una molécula clave en la regulación de los procesos apoptóticos de casi todos los tipos celulares. De manera consistente, en experimentos *in vitro* Csaki y colaboradores (Csaki *et al.*, 2008) mostraron que la IL-1 β induce la apoptosis de los condrocitos deprivados de suero mediante la inducción de la síntesis y activación de p53, y que el tratamiento con resveratrol, un compuesto fenólico natural que induce la degradación de p53, inhibe la apoptosis de condrocitos inducida por dicha citocina (Csaki *et al.*, 2008). Asimismo, en estudios en los que evalúan la apoptosis de los condrocitos inducida por estímulos proapoptóticos como los donadores de NO, toxinas, y el estrés mecánico, también reportan el incremento de la expresión de p53. No obstante, aún falta por dilucidar elementos que también podrían estar implicados, entre estos, las caspasas y las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que pueden o no ser modulados por p53.

Cabe considerar que la efectividad del TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ pudiera estar influenciada por su combinación y el equilibrio entre las dosis de cada una de ellas. Esto, a razón de que en nuestras manos, cuando se aumentó al doble la IL-1 β (cit3 vs cit1) se dejó de observar el efecto apoptótico de las citocinas (Fig. 5). Es importante mencionar que para poder entender de manera adecuada el grado de participación de cada una de estas citocinas es necesario ampliar el número de experimentos donde se comparen cuidadosamente las proporciones de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ variando una a una sus concentraciones. No obstante, este resultado pone de manifiesto la importancia de la concentración de cada una de las citocinas y de la relación entre ellas. En apoyo a esta consideración es importante mencionar que en modelos experimentales de artritis inducida, la concentración de TNF- α se incrementa por arriba de la IL-1 β (Szekanecz *et al.*, 2000), e incluso el incremento de TNF- α antecede al de IL-1 β (Müssener *et al.*, 1997). Sin embargo, la interrelación entre estas citocinas es compleja, ya que se ha descrito que en ratones

knock-out para IL-1 β , la sobre-expresión de TNF- α no promueve la destrucción del cartílago (Zwerina *et al.*, 2007) y que solo en presencia de la IL-1 β , la sobre-expresión del TNF- α es capaz de inducir todas las características de la artritis, incluyendo la inflamación de la membrana sinovial, la erosión ósea, y la destrucción del cartílago, lo que indica que la IL-1 β media la degradación del cartílago inducida por el TNF- α (Zwerina *et al.*, 2007). Nuestros hallazgos son consistentes con estas consideraciones ya que muestran que la proporción de las citocinas pro-inflamatorias es importante para mediar la destrucción del cartílago por apoptosis.

Es conocido que casi todas las células de mamífero pueden expresar iNOS en respuesta a la estimulación con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (Drapier *et al.*, 1988; Kilbourn y Belloni, 1990). Ejemplo de ello son los condrocitos (Sakurai *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1997) y las células sinoviales, que en respuesta a estas citocinas producen NO (Sakurai *et al.*, 1995; McInnes *et al.*, 1996). En base a esto se ha sugerido al NO como un denominador común de la acción de las citocinas pro-inflamatorias. Diversos reportes indican que el NO puede desempeñar un papel dual sobre el cartílago. Bajo condiciones fisiológicas, participa en el recambio de su matriz (Häuselmann *et al.*, 1998) y lo protege contra la degradación del agregón (Bird *et al.*, 2000), sin embargo, bajo condiciones inflamatorias, la iNOS produce NO incluso más de mil veces por arriba de su producción normal (Stichtenoth y Frölich, 1998). Si bien la producción de NO a estos niveles constituye un mecanismo de defensa en contra de agente infecciosos, también constituyen una amenaza para los tejidos (Ialenti *et al.*, 1992), y a su vez para las células en las cuales se produce. Por lo tanto, se ha propuesto al NO como un promotor clave del daño al cartílago artrítico y de la apoptosis de los condrocitos. En modelos de artritis como la inducida por colágena, se ha reportado que la expresión de la iNOS y la producción de nitritos y nitratos se incrementan paralelamente al desarrollo de la patología (Cannon *et al.*, 1995). Además, mientras que el uso de un inhibidor de las sintasas del NO (L-NAME) reduce la producción de nitritos y nitratos y la progresión de la AR (incluida la inflamación articular) (Stichtenoth y Frölich, 1998), la administración de L-arginina (sustrato para la producción de NO) aumenta la generación de nitritos y potencia la enfermedad (Stichtenoth y Frölich, 1998).

Adicionalmente a los trabajos que señalan al NO como mediador de los efectos proapoptóticos de las citocinas pro-inflamatorias sobre el cartílago, en este trabajo encontramos que la combinación de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ induce la producción de NO en condrocitos

cultivados (Fig. 8 y 10) y que este NO producido por los condrocitos, media la muerte por apoptosis de los mismos, ya que dicha apoptosis se bloquea cuando se reduce la producción de NO con L-NAME, un inhibidor no específico de las sintasas del NO (Fig. 8). Sin embargo, el hecho de que el L-NAME haya producido una disminución parcial de los niveles de NO sugiere que solo una porción del NO inducido por las citocinas es suficiente para mediar sus efectos proapoptóticos (Figs. 8 y 9).

El hecho de haber encontrado que la acción proapoptótica del TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ sobre los condrocitos involucra la producción de NO y la expresión p53 mostró que nuestro modelo era adecuado para valorar los efectos directos de la prolactina y de las vasoinhibinas sobre la supervivencia de este tipo celular, y por ende, sobre la progresión de padecimientos artríticos. La propuesta del efecto antiapoptótico de la PRL en el cartílago articular tomó como base estudios previos que muestran que la hormona estimula la supervivencia de diversos tipos celulares entre los que se incluyen el epitelio mamario (Humphreys y Hennighausen, 1999), el tejido decidual (Tessier *et al.*, 2001) y el linfoide (Krishnan *et al.*, 2003). Mas directamente, hallazgos de nuestro grupo mostraron que la PRL inhibe la apoptosis inducida por privación de suero en condrocitos en cultivo (Zermeño *et al.*, 2006) y la apoptosis del cartílago inducida por la inyección intra-articular de las citocinas mencionadas (TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ) (Guzmán-Morales, 2008; Adán, 2008).

Acorde con estos resultados, en este trabajo mostramos que la PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos en cultivo inducida por la combinación de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . Si bien, dicho efecto fue visible bajo las cuatro dosis de PRL utilizadas, se están llevando a cabo experimentos con concentraciones menores de PRL para determinar un efecto dosis-dependiente. No obstante, podemos concluir que la PRL protege a los condrocitos contra la apoptosis inducida por estas citocinas a través de un mecanismo que involucra, al menos en parte, su acción directa sobre dicho tipo celular. Apoyamos esta aseveración en el hecho de que condrocitos *in situ* e *in vitro* expresan al receptor de PRL (Zermeño *et al.*, 2006; Macotela *et al.*, 2006), y que la PRL protege a los condrocitos cultivados contra la apoptosis inducida por disminución de suero (Zermeño *et al.*, 2006). Asimismo, cabe mencionar que entre los antecedentes que nos permitieron sugerir que la PRL puede proteger a los condrocitos bajo condiciones inflamatorias, fue el hecho de que en la articulación artrítica, el RPRL se expresa tanto en linfocitos T infiltrados como en fibroblastos de

la membrana sinovial, dos tipos celulares que orquestan el proceso inflamatorio (Nagafuchi *et al.*, 1999). Además, un estudio previo de nuestro laboratorio con fibroblastos de pulmón, un tipo celular importante para las reacciones inflamatorias de las vías respiratorias, mostró que la PRL es capaz de inhibir la expresión de la iNOS y la producción de NO en respuesta al TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ (Corbacho *et al.*, 2003), lo que señaló al NO como un candidato lógico por el cual la PRL podría mediar sus efectos antiapoptóticos. Sin embargo, en este caso, teniendo como modelo el cultivo primario de condrocitos, no encontramos evidencias de que la PRL inhiba la producción de NO inducida por dichas citocinas, aún usándolas a concentraciones sobre las cuales la PRL tenía un claro efecto inhibitorio. Esto excluye a la inhibición del NO como un mecanismo posible por el cual la PRL media sus acciones antiapoptóticas en condrocitos. No obstante, observamos que la PRL si inhibe el aumento en la expresión de p53 inducida por dichas citocinas. La importancia de este resultado radica en que p53 ha sido detectado en condrocitos apoptóticos del cartílago articular en artritis reumatoide y osteoartritis, y que incluso, se ha establecido una correlación entre la expresión de p53, la apoptosis y la degradación del cartílago (Yatsuji *et al.*, 2000), de manera que este hallazgo pone de manifiesto el potencial de PRL para proteger a los condrocitos contra la apoptosis mediada por p53 bajo condiciones inflamatorias. Más aún, al ser p53 blanco de PRL, esta podría detener indirectamente a elementos activados río abajo de p53, como los complejos sistemas de caspasas y proteínas proapoptóticas como Bax y Bcl-X_S (Nagata, 2000). Sin embargo, no podemos descartar que también pudiera estar actuando de manera directa, ya sea inhibiendo caspasas como se ha reportado que lo hace en células de la decidua uterina (Tessier *et al.*, 2001), o estimulando proteínas de supervivencia celular como Bcl-2, Bcl-X_L, y XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) como lo hace en células de origen inmune (Leff *et al.*, 1996; Kochendoerfer *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2003).

Si bien estos hallazgos reflejan lo complejo que es el mecanismo por el cual la PRL protege a los condrocitos, la situación adquiere un nivel de complejidad mayor cuando se involucra a sus metabolitos, las vasoinhibinas. En este estudio encontramos que a diferencia de la molécula íntegra de PRL, las vasoinhibinas estimulan la apoptosis de los condrocitos. El efecto de las vasoinhibinas fue dosis-dependiente y comparable al de la combinación de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , ya que ambos tratamientos incrementaron entre 50 y 100% más la apoptosis de los condrocitos respecto al control.

De esta manera, queda claro que la PRL contiene en su molécula la capacidad de estimular e inhibir la supervivencia del cartílago a través de acciones directas sobre los condrocitos, y que la resultante final de su efecto depende de la actividad de proteasas como la catepsina D, la proteína morfogénica de hueso 1 (BMP1) y las MMPs capaces de procesarla hacia vasoinhibinas. La catepsina D es una aspartil endoproteasa cuya actividad proteolítica está restringida a microambientes ácidos de vesículas intracelulares como lisosomas, fagosomas y gránulos secretorios (pH<5.5) (Rocheffort *et al.*, 2000; Cruz-Soto *et al.*, 2009), razón por la cual produce vasoinhibinas a pH ácido pero no a pH neutro (Piwnica *et al.*, 2004; Macotela *et al.*, 2006; Cruz-Soto *et al.*, 2009). La BMP1 por su parte, es el prototipo de un subgrupo de MMP estructuralmente similares conocidas también como BMP1-like-MMP, que procesan a la PRL humana en un solo sitio conservado y generan vasoinhibinas de 18 kD (Ge *et al.*, 2007). En cuanto a las MMPs, son de interés especial para esta tesis, por que pueden ser inducidas mediante citocinas pro-inflamatorias, y además, participan en la degradación de la matriz extracelular del cartílago artrítico. Entre las MMPs estimuladas por citocinas pro-inflamatorias se encuentran las MMP-2, 9, 3, 1, 13, 14, 15 y 8 (Huet *et al.*, 1993; Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006), entre las cuales, las MMP-8, 13, 3, 1, 2 y 9, son capaces de procesar a la PRL hacia vasoinhibinas (Macotela *et al.*, 2006).

La posibilidad de que el NO participara en los efectos proapoptóticos de las vasoinhibinas, también tiene antecedentes en trabajo de nuestro laboratorio. Se encontró que las vasoinhibinas promueven la expresión de la iNOS y la producción de NO en fibroblastos de pulmón con una potencia comparable a la combinación del TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ . De hecho, fueron precisamente los efectos opuestos que tienen PRL y vasoinhibinas sobre la expresión de la iNOS en fibroblastos de pulmón, lo que dió pie a sugerirlas como reguladores posibles de la inflamación y establecer su conexión con citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, ni las vasoinhibinas ni la PRL modificaron la producción de NO por los condrocitos en cultivo, lo cual indica que el NO no es uno de los mecanismo por los cuales la PRL protege de la apoptosis a los condrocitos, ni por el cual las vasoinhibinas la inducen. Por lo tanto, queda pendiente determinar el mecanismo responsable del efecto proapoptótico de las vasoinhibinas sobre los condrocitos. Al respecto, se conoce que las vasoinhibinas promueven la muerte por apoptosis del endotelio vascular tanto *in vivo* (Clapp *et al.*, 1993; Dueñas *et al.*, 2004) como *in vitro* (Martini *et al.*, 2000). Entre los mecanismos asociados a la apoptosis inducida por las

vasoinhibinas se reportan la activación de la proteína proapoptótica Bcl-X_s y la inactivación de ICAD (inhibidor de DNAsas activadas por caspasas), la fragmentación de DNA y la activación rápida de la caspasa 1, 3 (Martini *et al.*, 2000), 8 y 9 (Tabruyn *et al.*, 2003).

Por último, es importante comentar que la PRL es un importante agente inmunoregulador, posee efectos estimuladores sobre el sistema inmune, y puede participar en su homeostasis ante retos inmunológicos asociados a traumas, infecciones e inflamación (Yu-Lee, 2002). Además, diversos agentes estresores estimulan la secreción adenohipofisaria de PRL a la circulación (Neill, 1970; Seggie y Brown, 1975) y se ha reportado que la PRL puede contrarrestar la acción de los corticoides y de otros agentes inmunosupresores secretados bajo condiciones de estrés (Torner *et al.*, 2001; Zamorano, 2006; Zamorano *et al.*, 2008). Asimismo, se ha propuesto que los altos niveles de PRL y lactógenos placentarios durante el embarazo desempeñan un papel en la regulación de la inmunosupresión fisiológica durante la gestación para la aceptación del producto y el funcionamiento adecuado del sistema inmune (Linzer y Fisher, 1999). El hecho de que las hormonas femeninas tengan un papel en la homeostasis del sistema inmune se asocia con el dimorfismo sexual que tiene lugar en varias de las enfermedades autoinmunes, incluyendo al lupus sistémico eritematoso, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, las cuales ocurren más frecuentemente en mujeres que en hombres (Ahmed *et al.*, 1985; Withacre *et al.*, 1999; Scott, 2007). Notablemente, los niveles circulantes de PRL son más altos en mujeres y en pacientes con estos padecimientos (Ghule *et al.*, 2009), y además, el tratamiento con bromocriptina, un agonista dopaminérgico que inhibe la secreción hipofisaria de PRL, mitiga la progresión de la autoinmunidad (Chuang y Molitch, 2007).

Los antecedentes aquí mencionados, en conjunto con los resultados de esta tesis, ponen de manifiesto la relevancia de las acciones múltiples de la PRL en condiciones de inflamación. Asimismo, el hecho de que bajo estas condiciones, el microambiente celular puede modificar el procesamiento de la hormona hacia vasoinhibinas con acciones opuestas sobre la supervivencia celular (resultados de esta tesis), la inflamación (Corbacho *et al.*, 2000, 2003), y las respuestas al estrés (Zamorano, 2006; Zamorano *et al.*, 2008), sugiere un mecanismo fino y económico de regulación donde las condiciones locales pueden ajustar la acción hormonal. Queda por determinar si las vasoinhibinas también influyen sobre otros efectos inmunes de la PRL. Consideramos que entre más información se obtenga acerca de estos mecanismos, más cerca

estaremos de entender el desarrollo y la progresión de las enfermedades inflamatorias en general y de las artríticas en particular, para entonces, poder acercarnos mejor a su control.

9. CONCLUSIONES

1. La PRL actúa directamente sobre los condrocitos inhibiendo la apoptosis inducida por la combinación de TNF- α , IL-1 β , e IFN- γ . Su mecanismo de acción no involucra la inhibición de la producción de NO inducida por dichas citocinas.

2. Las vasoinhibinas estimulan la apoptosis de los condrocitos por un mecanismo independiente al de la producción de NO.

3. La PRL y las vasoinhibinas ejercen acciones opuestas sobre la supervivencia del cartílago y el equilibrio entre ambos efectos podrían representar un mecanismo importante para el ajuste fino de dicho proceso bajo condiciones de inflamación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JM y Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Adams CS y Horton WE Jr. 1998. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat. Rec.* 250, 418-425.
- Adán N. 2008. Análisis del efecto de la prolactina en la supervivencia del cartílago articular. TESIS. Licenciatura en Biología. Escuela de Biología, BUAP. Puebla. 34 pp.
- Ahmed SA, Pnhale PJ y Talal N. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases: Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121, 531-541.
- Aigner T, McKenna L. 2002. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 5-18.
- Alfaro E, García, C y Dueñas A. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología* 46, 275-280.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2947-2953.
- Ashkenazi A y Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Bachelot A y Binart N. 2007. Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 133: 361-369.
- Bahrami S, Plate U, Dreier R, Du Chesne, Willital G-H y Bruckner P. 2001. Endochondral ossification of costal cartilage is arrested after chondrocytes have reached hypertrophic stage of late differentiation. *Matrix Biol.* 19, 707-715.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS y Nicoll CS. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133, 935-938.
- Bao X, Cui J, Wu Y, Han X, Gao C, Hua Z y Shen P. 2007. The role of endogenous reactive oxygen species and nitric oxide in Tripolide-induced apoptotic cell death in macrophages. *J Mol Med.* 85, 85-98.
- Benjamin M y Ralphs RJ. 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. *J. Anat.* 193, 481-494.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL y Steinmetz RW. 1996. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17, 639-669.
- Berglund H, Olerenshaw D, Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ y Driscoll PC. 2000. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *J. Mol. Biol.* 302, 171-188.

- Bird JL, May S y Bayliss MT. 2000. Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. *Equine Vet. J.* 32, 133-139.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N y Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J y Kelly PA. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53, 69-77.
- Breedveld FC. 1999. Future trends in the treatment of rheumatoid arthritis: cytokine targets. *Rheumatology (Oxford)* 38, 11-13.
- Breedveld FC. 2004. Osteoarthritis -- the impact of a serious disease. *Rheumatology (Oxford)* 43, i4-i8.
- Bucht A, Larsson P, Weisbrot L, Thorne C, Pisa P, Smedegård G, Keystone EC y Grönberg A. 2007. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 103, 357-367.
- Burrage PS, Mix KS y Brinckerhoff CE. 2006. Matriz metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* 11, 529-543.
- Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, Warden PJ, Kollias G, Maini RN, Feldmann M y Brennan FM. 1997. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J. Immunol.* 159, 2867–2876.
- Cain K. 2003. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab. Rev.* 35, 337-363.
- Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB Jr, Hoidal JR, Huecksteadt TP y Griffiths MM. 1995. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 1677-1684.
- Caramés B, López-Armada MJ, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Vaamonde C, Galdo F y Blanco FJ. 2008. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 16, 715-722.
- Chen CJ, Lin JH, Wu LS, Tsai YF, Su TH, Chen JH y Chen JT. 2002. Luteotropic roles of prolactin in early pregnant hamsters. *Biol. Reprod.* 67, 8–13.
- Chen CH, Lin KC, Yu DT, Yang C, Huang F, Chen HA, Liang TH, Liao HT, Tsai C, Wei JC y Chou CT. 2006. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-13 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 45, 414-420.

- Chen JH, Cao JL, Chu YL, Wang ZL, Yang ZT y Wang HL. 2008. T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 9, 455-463.
- Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Christodoulou C y Choy EH. 2006. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.* 6, 13-19.
- Chuang E y Molitch ME. 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed* 78, 255-261.
- Clancy RM, Gomez PF y Abramson SB. 2004. Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 552-558.
- Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: Characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121, 2055-2064.
- Clapp C y Weiner RI. 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130, 1380-1386.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F y Weiner RI. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133, 1292-1299.
- Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA y Martinez de la Escalera G. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10384-10388.
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC y Martinez de la Escalera G. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 301-307.
- Clapp C, Thebault S y Martinez de la Escalera G. 2008. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 55-67.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez de la Escalera G, Freeman BA y Clapp C. 2000. Proteolytic cleavage confers NO synthase inducing activity upon prolactin. *J. Biol. Chem.* 275, 13183-13186.
- Corbacho AM, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinol.* 173, 219-238.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 544, 171-175.

Cruz-Soto ME, Cosío G, Jeziorski MC, Vargas-Barroso V, Aguilar MB, Carabez A, Berger P, Saftig P, Arnold E, Thebault S, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2009. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophysial vaso-inhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 150, 5446-5454.

Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K y Shakibaei M. 2008. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 75, 677–687.

D'Angelo G, Struman I, Martial J y Weiner RI. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 6374–6378.

D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J y Weiner RI. 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 692–704.

Daugas E, Susin AS, Zamzami N, Ferri FK, Ironopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J y Kroemer G. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14, 729-739.

Dayer JM. 2003. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, ii3–ii10.

Dragovich T, Rudin CM y Thompson CB (1998) Signal transduction pathway that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17, 3207-3212.

Drapier JC, Wietzerbin J y Hibbs JB Jr. 1988. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. immunol.* 18, 1587-1592.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2049–2055.

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B y Van Der Vliet A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391, 393-397.

Emery P, Williamson DJ y MacKay IR. 1987. Role of cytokines in rheumatological inflammation. *Concepts Immunopathol* 4, 171-179. En: Westacott IC, Whicher TJ, Barnes CI, Thompson D, Swan JA y Dieppe AP. 1990. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 676-681.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A y Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

- Farrel AJ, Blake DR, Palmer RMJ y Moncada S. 1992. Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide síntesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 1219-1222.
- Fitzgerald P y Dinan GT. 2008. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 22, 12-19.
- Fraser A y Evan G. 1996. A license to kill. *Cell* 85, 781-784.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A y Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80, 1523–1631.
- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A y Kelly PA. 1997. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue defferentiation and development. *J. Clin. Invest.* 199, 1107-1117.
- Gabriel SE. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 27, 269-281.
- Garcia C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, Lopez-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernandez-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM y Clapp C. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J. Clin. Invest.* 118, 2291–2300.
- Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E y Sanchez-Criado JE. 1997. Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. *Biol. Reprod.* 57, 478–486.
- Ge G, Fernandez CA, Moses MA y Greenspan DS. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10010–10015.
- Ghule S, Dhotre A, Gupta M, Dharme P y Vaidya SM. 2009. Serum prolactin levels in women with rheumatoid arthritis. *Biomedical Reserch.* 20, 115-118.
- Goffin V, Bernichtein S, Touraine P y Kelly AP. 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr. Rev.* 26, 400–422.
- Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF y Hovey RC. 2005. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 232, 9–19.
- Goldring BM. 2000. Ther role of the chondrocytes in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1916-1926.
- Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Munoz M, Rubio R, Lin SH, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145, 5714–5722.

- Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM y Ralston SH. 1996. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis: detection using the casting urinary nitrite/creatinine ratio. *Eur. J. Pharmacol.* 110, 701-706.
- Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA y Binart N. 2003. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 1-12.
- Gross A, McDonnell JM y Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.
- Guzmán-Morales J. 2008. Análisis del efecto antiapoptótico de la PRL sobre el cartílago articular. TESIS. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Instituto de Neurobiología, UNAM. Juriquilla, Querétaro. 60 pp.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S y Lotz M. 1998. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1632-1638.
- Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S, Fujishiro T, Takebe K, Kansaki N, Kuroda R y Kurosaka M. 2009. Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain. *Arthritis Rheum.* 60, 2340-2349.
- Häuselmann JH, Stefanovic-Racic M, Michel AB y Evans HC. 1998. Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: Implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. *J. Immunol.* 160, 1444-1448.
- Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y y Jasin HE. 1997. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 40, 261-269.
- Heinegard D y Oldberg A. 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3, 2042-2051.
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A y Drexler H. 2007. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128, 589-600.
- Wang H, Wang Z, Chen J y Wu J. 2007. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulate NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes. *Cell Biol. Int.* 31, 1027-1035.
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M e Imawaka Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 313-320.
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E y Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16, 6926-6935.

- Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, Lafyatis R, Duquesnoy B y Degand P. 1993. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 36, 772-780.
- Humphreys RC y Hennighausen L. 1999. Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis. *Cell Growth Differ.* 10, 685-694.
- Hunter JD y Felson TD. 2006. Osteoarthritis. *BMJ* 332, 639-642.
- Ialenti A, Ianaro A, Moncada A y Di Rosa M. 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 217, 177-182.
- Janmey PA. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78, 763-781
- Jeffrey RD y Watt I. 2003. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol* 76, 777-787.
- Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE y Gay S. 2006. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol. Lett.* 106, 8-13.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D y Kollias G. 1991. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *EMBO J.* 10:4025-4031.
- Kilbourn RG y Belloni P. 1990. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1 or endotoxin. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 772-776.
- Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS y Chun JS. 2002. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J. Biol. Chem.* 277, 1332-1339.
- Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY y Lin SH. 2003. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res.* 63, 386-393.
- Ko JY, Ahn YL y Cho BN. 2003. Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactin-expressing plasmid into muscle. *Mol. Cells.* 15, 262-270.
- Koch AE, Kunkel SL y Strieter RM. 1995. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J. Investig. Med.* 43, 28-38.
- Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ y Buckley AR. 2003. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J. Endocrinol.* 178, 265-273.
- Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11, 101-105.
- Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND y Buckley AR. 2003. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144, 2102-2110.

- Kroemer G, Zamzami N y Susin SA. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18, 44-51.
- Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S y Lotz M. 2004. Cell death in cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 1-16.
- Kunkel SL, Lukacs N, Kasama T y Strieter RM. 1996. The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J. Leukoc. Biol.* 58, 6-12.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J y Weiner RI. 1998. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139, 3696-3703.
- Lee SH, Kunz J, Lin SH y Yu-Lee LY. 2007. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res.* 67, 11045-11053.
- Leff MA, Buckley DJ, Krumenacker JS, Reed JC, Miyashita T y Buckley AR. 1996. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 137, 5456-5462.
- Lesauskaite V y Ivanoviene L. 2002. Programmed cell death: molecular mechanisms and detection. *Medicina (Kaunas)* 38, 869-875.
- Li H y Yuan J. 1999. Deciphering the pathways of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 261-266.
- Linzer DIH y Fisher SJ. 1999. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 13, 837-840.
- Liu XS, Kim CN, Yang J, Jemmerson R y Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 86, 147-157.
- López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F y Blanco FJ. 2006. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 660-669.
- Lowe SW y Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495.
- Macotella Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J. Cell Sci.* 119, 1790-1800.
- Malaguarnera L, Pilastro MR, Quan S, Ghattas MH, Yang L, Mezentsev AV, Kushida T, Abraham NG y Kappas A. 2002. Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 10, 433-440.
- Martel-Pelletier J, Welsch DJ y Pelletier JP. 2001. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 805-829

- Martin SJ y Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 82, 349-352.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM y Green DR. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545-1556.
- Martin DA y Elkon KB. 2004. Mechanisms of apoptosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 30, 441-454.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA y Weiner RI. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol. Endocrinol.* 14, 1536-1549.
- Marvin YL y Hubert TK. 2004. Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF- 1. *J. Orthop. Res.* 22, 140-144.
- Mateo L, Nolla JM, Bonnin MR, Navarro MA y Roig-Escofet D. 1998. High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25, 2077-2082.
- McCauley RT y Disler GD. 1998. MR Imaging of articular cartilage. *Radiology* 209, 629-640.
- McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R y Liew FY. 1996. Production of nitric oxide in the synovial membrane of heumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.* 184, 1519-1524.
- Mistry D, Oue Y, Chambers MG, Kayser MV y Mason RM. 2004. Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 131-41.
- Monfort J, Garcia-Giralt N, Lopez-Armada MJ, Monllau JC, Bonilla A, Benito P y Blanco FJ. 2006. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res. Ther.* 8:R149.
- Müssener A, Litton MJ, Lindroos E y Klareskog L. 1997. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* 107, 485-493.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS y Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activación. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.
- Nagafuchi H, Szuki N, Kaneko A, Asai T y Sakane T. 1999. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26, 1890-1900.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256, 12-18.

Neidel J, Schulze M y Lindschau J. 1995. Association between degree of bone erosion and synovial fluid levels of tumor necrosis factor α in the kneejoints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.* 44, 217-221.

Neill JD. 1970. Effects of the “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87, 1192-1197.

Nguyen NQ, Cornet A, Blacher S, Tabruyn SP, Foidart JM, Noel A, Martial JA y Struman I. 2007. Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol. Ther.* 15, 2094–2100.

Oberhammer FA, Hochegger K, Fröschl G, Tiefenbacher R y Pavelka M. 1994. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol.* 126, 827-837.

Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E y Gracia-Ruiz JP. 2002. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 190, 51-63.

Olazabal I, Muñoz J, Ogueta S, Obregón E y García-Ruiz JP. 2000. Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation: Inhibition by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 14, 564-575.

Olee T, Hashimoto S, Quach J y Lotz M. 1999. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J. Immunol.* 162, 1096-1100.

Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N y Kelly PA. 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11, 167–178.

Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N y Mihara K. 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space, *Embo J.* 24, 1375–1386.

Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I y Grant MB. 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2413-2419.

Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S y Lajeunesse D. 2002. Study of the role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum.* 46, 1804–1812.

Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G y Martel-Pelletier J. 1996. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1RA synthesis by human articular chondrocytes: possible role in OA cartilage degradation. *Osteoarthr. Cartil.* 4, 77-84.

- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA y Goffin V. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol. Endocrinol.* 18, 2522–2542.
- Polzer K, Schett G y Zwerina J. 2007. The lonely death: Chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis. *Autoimmunity* 40, 333-336.
- Poole AR. 1991. The growth plate: cellular physiology, cartilage assembly and mineralization. En Hall KB y Newman AS (Eds.), *Cartilage: Molecular Aspects.* (pp. 179-211), Florida, USA: CRC Press.
- Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM y Roger P. 2000. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin. Chim. Acta* 291, 157–170.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y y Tsujimoto Y. 1999. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401, 168-173.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirta Y, Kanno K, Siato I y Miyasaka N. 1995. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.* 96, 2357-2363.
- Sandell LJ y Aigner T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3, 107-113.
- Schultz DR y Harrington WJ Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* 32, 345-369.
- Scott LD. 2007. Early rheumatoid arthritis. *Br. Med. Bull.* 81, 97-114.
- Seggie JA y Brown GM. 1987. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 53, 629-637.
- Sen M. 2005. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 44, 708-713.
- Seriolo B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D y Cutolo M. 2002. Serum prolactin levels in male patients with rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 258–262.
- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* 16, 354-369.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C y Brancolini C. 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J. Cell Sci.* 112, 4475-4482.
- Shi J y Wei Lei. 2007. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 55, 61–75.

- Slee EA, Adrain C y Martin SJ. 1999. Serial Killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-1074.
- Smith BJ y Haynes KM. 2002. Rheumatoid Arthritis: A molecular understanding. *Ann. Intern. Med.* 136, 908-922.
- Srivastava RK, Gu Y, Ayloo S, Zilberstein M y Gibori G. 1998. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 355–362.
- Stichtenoeh DO y Frolich JC. 1998. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *British Society for Rheumatology* 37, 246-257.
- Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Haines GK-III, Kunkel SL, Burdick MD y Koch AE. 2000. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1266-1277.
- Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA y Struman I. 2003. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol. Endocrinol.* 17, 1815–1823.
- Tabruyn SP, Nguyen NQ, Cornet AM, Martial JA y Struman I. 2005. The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0–G1 and the G2-M phases. *Mol. Endocrinol.* 19, 1932–1942.
- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y y Gibori G. 2001. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/Protein Kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 142, 4086-4094.
- Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136, 5454-5460.
- Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R y Neumann ID. 2001. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.* 21, 3207–3214.
- Tzeng SJ y Linzer DI. 1997. Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 45-52.
- Withacre CC, Reingold SC y O’Looney PA. 1999. Task force on gender, multiple sclerosis and autoimmunity. A gender gap in autoimmunity. *Science* 283, 1277-1278.
- Wood LJ y Chen J. 2007. DNA damage sensing and signaling. En Q Wei, L Li y Chen JD (Eds.), *DNA repair, genetic instability, and cancer.* (pp. 1-22), Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Yatsugi N, Tsukazaki T, Osaki M, Koji T, Yamashita S y Shindo H. 2000. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of

cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci* 5, 150-156.

Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 435 -455.

Zamorano RM. 2006. Análisis de las prolactinas como mediadores centrales de la respuesta de ansiedad al estrés. TESIS. Maestría en Ciencias, Neurobiología. Instituto de Neurobiología, UNAM. Juriquilla, Querétaro. 60 pp.

Zamorano M, Torner L, Vega C, Aranda J, Quintanar-Stephano A, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2006. Análisis del efecto ansiolítico de la prolactina sistémica. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Querétaro. Septiembre 2006.

Zamorano RM, Torner AL, Aranda LJ, Vera C, Vega CC, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2008. La prolactina hipotalámica y su relación con el estrés. LI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Mérida, Yucatán. Septiembre 2008.

Zermeño C, Guzmán-Morales J, Macotella Y, Nava G, López-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C y de la Escalera GM, Clapp C. 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J. Endocrinol.* 189, R1-R8.

Zimmermann CK y Green RD. 2001. How cells die. Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, S99-S103.

Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen SJ, van der Berg W y Schett G. 2007. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11742-11747.

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa de una articulación móvil (rodilla).....	10
Figura 2. Efectos de las citocinas pro-inflamatorias sobre los condrocitos del cartílago articular en la artritis reumatoide.....	10
Figura 3. Activación del sistema PRL/RPRL.....	20
Figura 4. Vías de señalización clásicas activadas por PRL a través de la isoforma larga de su receptor.....	21
Figura 5. Análisis cuantitativo por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con tres combinaciones de citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2, cit3) en presencia o ausencia de PRL (100 nM) o L-NAME (1mM).....	29
Figura 6. Análisis cuantitativo por elisa ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (cit1) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de PRL (12.5, 25, 50, y 100 nM)	30
Figura 7. Análisis de la expresión del ARNm de p53 por RT-PCR en tiempo real en condrocitos cultivados durante 24 h con o sin citocinas pro-inflamatorias (cit1) en presencia o ausencia de PRL (100 nM).....	30
Figura 8. Análisis cuantitativo de los metabolitos estables de la oxidación del NO mediante la reacción de Griess. La gráfica indica la producción de NO en μ M de nitritos (NO ₂) y nitratos (NO ₃) producidos por condrocitos cultivados durante 24 h bajo la estimulación de citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2 y cit3) en presencia o ausencia de PRL (100 nM) o L-NAME (1 mM).....	31
Figura 9. Análisis cuantitativo por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con dosis crecientes de vasoinhibinas (0.1, 1.0 y 10 nM).....	32

Figura 10. Análisis cuantitativo de los metabolitos estables de la oxidación del NO mediante la reacción de Griess. La gráfica indica la producción de NO en μM de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3) producidos por condrocitos cultivados en presencia de PRL (100nM), Vi (10nM) y citocinas pro-inflamatorias (cit1, cit2 y cit3) por 24 h..... **32**