



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
CAMPUS UNAM JURQUILLA, QRO**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS VASOINHIBINAS
SOBRE LA APOPTOSIS DE LOS CONDROCITOS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (Neurobiología)**

PRESENTA

Biól. Sonia Ivonne Perales Canales

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez



Juriquilla, Querétaro

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Clapp Jiménez y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 191523

Agradezco el apoyo invaluable de las siguientes personas:

La dirección académica del comité tutorial integrado por las Doctoras Carmen Clapp Jiménez, Maricela Luna Muñoz y María del Carmen Mejía Vázquez. Así como a los sinodales los Doctores Carmen Aceves, Manuel Aguilar Ramírez y Andrés Quintanar Sthepano.

El apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera y del M. en C. Gabriel Nava Pinto.

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 ayuda de los miembros de la biblioteca del Instituto de Neurobiología: Bib. Pilar Galarza Barrios, Ignacio Caballero Navarro, Rafael Silva Cruz. De igual manera agradezco el apoyo de la Unidad de Proteogenómica dirigida por la Dra. Anaid Antaramián Salas y el Dr. Manuel Aguilar Ramírez.

La asistencia de la Q. Leonor Casanova Rico, así como la colaboración de Yolanda Orduña Cruz y Magdalena Reyes Olán.

Dedicatorias

A mi mamá María, por que siempre creíste en mi, por enseñarme a que nada es imposible en la vida, se que estarías orgullosa de mi. Te Quiero Mucho

A mi papá Jesús, por su total e incondicional cariño, apoyo, comprensión y paciencia, por los momentos difíciles y los sacrificios, por hacerme entender que las cosas más difíciles son las que mas valen la pena. Gracias

A Rox por estar a mi lado y motivarme, por todos los momentos especiales que hemos vivido y que seguiremos teniendo eh! por eso somos hermanas

A Jorge que a su manera siempre estuvo conmigo

A mis tíos Estela y Ramón, por su palabras de aliento para que yo pudiera seguir mis metas, por que están presentes en los malos y buenos tiempos

A mis sobrinos Katia y Hernan que los quiero muchísimo, espero que esto les sirva de ejemplo para que cumplan todos sus sueños por difíciles que sean

A Edaena, Tere y Maritza, que aunque nos separamos hace algunos años, seguimos juntas, por que la distancia no ha servido para alejarnos

A Mayda gracias por permitirme ser tu amiga, por escucharme siempre, por la paciencia, las criticas, los enojos, el estrés, las risas, el llanto y la enfermedad, ya formas parte de mi familia

A Jessica y Carlos les agradezco todo el apoyo, la amistad y las platicas, obviamente Jessica eres mi zenzei y no sabes de qué manera valoro toda la paciencia que me tuviste en los días de trabajo, cuando estuve enferma y hasta en fiestas. Muchas gracias por todo

A Guillermo, por que gracias a ti es que comenzó esta etapa de mi vida, y se que sabes que fuiste, eres y serás importante siempre

A Fer, Celina, Claudia, Adrián, Tere, Judith. Gracias por su amistad

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABSTRACT	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	1
Cartílago y Condrocitos	1
Artritis Reumatoide y Osteoartritis	3
Apoptosis	4
Fase de iniciación	6
Fase efectora	7
Fase ejecutora o de manifestación de la apoptosis	8
Apoptosis del cartílago	9
Óxido Nítrico	10
Prolactina y Vasoinhibinas	13
PRL, Vasoinhibinas y Cartílago	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	17
METODOLOGIA	18
Vasoinhibinas	18
Aislamiento y cultivo de condrocitos	18
Evaluación de la apoptosis <i>in vitro</i>	18
Detección de Muerte Celular por el Ensayo ELISA	19
Evaluación de NO	19
Aislamiento de RNA, RT-PCR y qPCR	20
RESULTADOS	21
Valoración de la diferenciación de condrocitos en cultivo	21
Efecto de vasoinhibinas sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo	21
Expresión de p53 en condrocitos en cultivo	25
Efecto de vasoinhibinas sobre la producción de NO por condrocitos en cultivo	26

Efecto del NO sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo	27
DISCUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Se esquematizan los cambios en la articulación que conducen a la destrucción del cartilago en las dos enfermedades más importantes de la articulación.	4
Figura 2: Tipos de muerte celular y sus características morfológicas.	6
Figura 3: Vías principales de apoptosis en mamíferos, responsables de mediar la vía extrínseca y la intrínseca.	9
Figura 4: Productos de RT-PCR para colágena II.	21
Figura 5: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 48 h a 10% y 0.5% de SFB y a concentraciones 1, 10 y 100 nM de vasoinhibina recombinante.	22
Figura 6: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 48 h a 10% de SFB y a concentraciones 1, 10 y 100 nM de vasoinhibinas generadas por proteólisis enzimática.	23
Figura 7: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 24 h a 10% de SFB y a concentraciones variables de vasoinhibinas, recombinante y generada por proteólisis enzimática.	24
Figura 8: Productos de RT-PCR para p53.	25
Figura 9: Producción de NO en cultivos de condrocitos expuestos durante 48 h a concentraciones variables (1, 10 y 100 nM) de vasoinhibinas recombinantes.	26
Figura 10: Producción de NO en cultivos de condrocitos expuestos a concentraciones variables de vasoinhibinas recombinantes y generadas por proteólisis enzimática durante 24 h.	27
Figura 11: Efecto de incubar durante 24 h a condrocitos en 10% de suero en presencia y ausencia del donador de NO, nitroprusiato de sodio (NPS).	28
Figura 12: Condrocitos en cultivo expuestos a una mezcla de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , INF- γ y TNF- α , en 10% de suero, durante 24 h.	29
Figura 13: Comparación de la producción de NO, la apoptosis, y el número de condrocitos incubados en 10% o en 0.5% de SFB durante 24 y 48 h.	30

ABSTRACT

The apoptosis of chondrocytes plays an important role in cartilage degradation in arthropathies. In rheumatoid arthritis, the overproduction of proinflammatory cytokines drives the release of high levels of nitric oxide (NO), a highly reactive gas with proapoptotic properties. The hormone prolactin (PRL) can be proteolytically modified to vaso-inhibins, a family of peptides able to induce the production of NO in certain cell types. Because, matrix metalloproteases (MMP) produced by chondrocytes cleave PRL to vaso-inhibins, and MMP are increased in rheumatoid arthritis, the aim of the present study was to investigate whether vaso-inhibins stimulate the apoptosis of chondrocytes via the stimulation of NO production. Chondrocytes isolated from femoral articular cartilage of male rats were cultured in the presence or absence of vaso-inhibins. DNA fragmentation evaluated by ELISA, and p53 expression by quantitative RT-PCR, measured apoptosis. Griess reaction measured NO production. The treatment with vaso-inhibins for 24 hours stimulated the apoptosis of chondrocytes and the expression of p53. However, vaso-inhibins did not stimulate NO production. Conversely, treatment for 24 hours with a mixture of proinflammatory cytokines (IL-1 β , INF- γ and TNF- α) or with sodium nitroprusiate, a NO donor, increased NO levels and stimulated the apoptosis of chondrocytes. While we confirm the proapoptotic action of NO in chondrocytes, we conclude that vaso-inhibins are proapoptotic for these cells through NO-independent mechanisms.

RESUMEN

La apoptosis de los condrocitos forma parte del proceso de destrucción del cartílago articular, característico de las enfermedades artríticas. En la artritis reumatoide, la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias conduce a la liberación de niveles elevados de óxido nítrico (NO), un gas altamente reactivo con propiedades pro-apoptóticas. La hormona prolactina (PRL) puede ser modificada proteolíticamente hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos capaces de inducir la producción de NO en forma comparable a la de citocinas pro-inflamatorias. En vista de todo ello, el objetivo del presente estudio fue analizar si el aumento en los niveles del NO es señal suficiente para disparar la apoptosis de los condrocitos y si las vasoinhibinas promueven la apoptosis de este tipo celular vía la estimulación de NO. Con este propósito, determinamos el efecto de las vasoinhibinas sobre la apoptosis y la producción de NO por condrocitos en cultivo. Así mismo, en estos cultivos celulares investigamos el efecto apoptótico del NO, ya sea en respuesta a un donador de NO como el nitroprusiato de sodio (NPS), o bien a una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , INF- γ y TNF- α). Los condrocitos fueron aislados del cartílago articular femoral de ratas prepúberes, la producción de NO se determinó mediante la reacción de Griess, y la apoptosis se evaluó a través de la fragmentación del DNA determinada por el ELISA específico, además de la expresión del gen supresor tumoral p53. Las vasoinhibinas, tanto recombinantes como obtenidas mediante la proteólisis enzimática de una preparación estándar de PRL, promovieron la apoptosis de los condrocitos después de 24 h de tratamiento. Sin embargo, no se observó efecto de vasoinhibinas sobre la producción de NO. Tanto el NPS como las citocinas pro-inflamatorias aumentaron significativamente la apoptosis y la producción de NO a las 24 h de tratamiento. Finalmente, las vasoinhibinas y las citocinas pro-inflamatorias indujeron la expresión de p53, un gen marcador de apoptosis. En conclusión, estos resultados indican que las vasoinhibinas son un factor pro-apoptótico para los condrocitos en cultivo y que su efecto no es mediado vía la producción de NO.

INTRODUCCIÓN

La apoptosis de los condrocitos forma parte del proceso de destrucción del cartílago articular, característico de las enfermedades artríticas. En la artritis reumatoide, la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias conduce a la liberación de niveles elevados de óxido nítrico (NO), un gas altamente reactivo con propiedades pro-apoptóticas. Evidencias recientes muestran que la hormona prolactina (PRL) inhibe la apoptosis de los condrocitos (Zermeño *et al.*, 2006) y que este efecto probablemente resulta de acciones autócrinas, dado que los condrocitos producen a la PRL y la procesan proteolíticamente hacia vasoinhibinas (Macotela *et al.*, 2006), una familia de péptidos con propiedades inhibitoras de la angiogénesis y promotoras de la inflamación. Además, se ha mostrado que la PRL y las vasoinhibinas despliegan acciones opuestas sobre el proceso inflamatorio vía efectos antagónicos sobre la expresión de la sintetasa endotelial inducible de NO (iNOS) (Corbacho *et al.*, 2000). La PRL inhibe la estimulación de la expresión de la iNOS inducida por citocinas pro-inflamatorias, al tiempo que las vasoinhibinas son importantes inductores de la iNOS en fibroblastos (Corbacho *et al.*, 2000). El propósito de este proyecto fue investigar si las vasoinhibinas podrían ejercer efectos estimulatorios sobre la apoptosis de los condrocitos vía la estimulación de la producción de NO.

A continuación se revisan aspectos generales de la fisiopatología del cartílago, de la apoptosis, de las vasoinhibinas y del NO que conforman el marco teórico del presente estudio.

CARTÍLAGO Y CONDROCITOS

Las articulaciones son las estructuras que unen huesos y permiten la movilidad del cuerpo humano. Las porciones finales de los huesos están revestidas por cartílago lo que le confiere superficies lisas, que permiten su rozamiento suave (Figura 1a). La membrana sinovial que recubre la cavidad articular produce el líquido sinovial con el fin de nutrir, proteger y lubricar al cartílago.

El cartílago es un tejido avascular, firme y flexible especializado para absorber y resistir la compresión. Además presenta una limitada capacidad de reparación, fundamentalmente por la baja tasa de proliferación y recambio de los condrocitos, su único tipo celular. Los condrocitos poseen un fenotipo altamente diferenciado que varía en función del entorno y presentan diferencias en su metabolismo, según su localización topográfica en el cartílago (Ito *et al.*, 2001).

Los condrocitos están inmersos y encapsulados por una matriz extracelular, en la que las principales macromoléculas son los proteoglicanos (agrecanos) responsables de asegurar la elasticidad del cartílago, y los colágenos que le dan su estructura. El principal tipo de colágeno del cartílago articular es el tipo II que representa un 80-90% del colágeno total de la matriz extracelular. Otros colágenos presentes en menores cantidades son los tipos IX (10%), XI (5%) y VI (1- 2%), XII y XIV. Los proteoglicanos están formados por una cadena proteica central, a la que se unen covalentemente moléculas de glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos se unen no covalentemente a las fibras de ácido hialurónico. La resistencia del cartílago proviene de la agregación de los proteoglicanos y de su entrelazamiento con las fibras de ácido hialurónico; el complejo se denomina agrecano. La matriz extracelular del cartílago está en constante remodelación vía procesos de anabolismo y catabolismo, controlados por diversas proteínas extracelulares que incluyen al factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), al factor transformante beta (TGF- β), al factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y a las metaloproteasas de matriz.

El cartílago se destruye al ser sustituido por hueso durante el crecimiento, pero también en patologías como la artritis reumatoide y la osteoartritis que son las principales causas de discapacidad severa en la población (Pelletier *et al.*, 1996). Se sabe que condrocitos procedentes de cartílagos artrósicos tienen características morfológicas de apoptosis (Blanco *et al.*, 1998).

ARTRITIS REUMATOIDE Y OSTEOARTRITIS

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de múltiples articulaciones. Esta inflamación va a ser la responsable del dolor, de la hinchazón que con frecuencia se observa y de la sensación de rigidez. Algunas articulaciones se afectan más que otras y hay algunas que nunca se alteran.

En el curso de este padecimiento, la infiltración de células inmunocompetentes hacia la cavidad articular y la proliferación de la membrana sinovial, generan una masa de tejido inflamatorio (panus) que, mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas, es capaz de invadir y destruir el cartílago y el hueso. El lugar del cartílago en el que se fija dicho panus se daña generando pequeñas erosiones, y al haber una inflamación crónica, el cartílago se adelgaza y desaparece. La sobrecarga de las articulaciones inflamadas contribuye a acelerar su destrucción (Figura 1b).

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica y degenerativa de las articulaciones que afecta principalmente a los adultos de edad media y avanzada, se caracteriza por la pérdida progresiva del cartílago que cubre los extremos de los huesos en las articulaciones, interfiriendo con su funcionamiento normal al producir dolor y limitación para la movilidad. Al perderse la cubierta de cartílago, el hueso que se encuentra inmediatamente por debajo rozará con el hueso vecino produciendo dolor (Figura 1c).

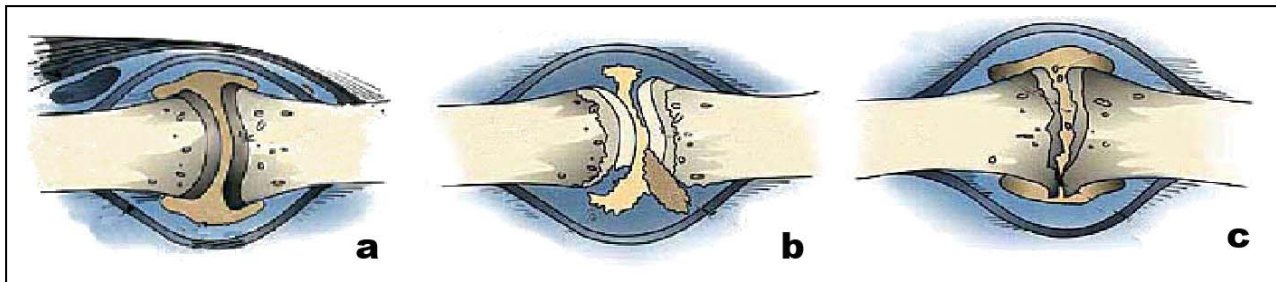


Figura 1: Se esquematizan los cambios en la articulación que conducen a la destrucción del cartílago en las dos enfermedades más importantes de la articulación. a) articulación normal, b) en la artritis reumatoide, la infiltración de células inmunocompetentes y la proliferación de la membrana sinovial genera una masa de tejido inflamatorio (panus) que, mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas, es capaz de invadir y destruir el cartílago articular y el hueso, c) en la osteoartritis el sobre uso y mal uso de la articulación conduce a cambios degenerativos y a la desaparición del cartílago articular.

La destrucción del cartílago que ocurre en la AR pero principalmente en la OA se ha relacionado con la apoptosis de los condrocitos. A continuación se revisan algunos aspectos del proceso apoptótico en general y en el cartílago en particular.

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular fisiológica es un proceso natural, necesario para el desarrollo y la existencia normal de los organismos multicelulares. La muerte de las células también puede ocurrir bajo condiciones patológicas en circunstancias violentas y catastróficas. La muerte bajo condiciones patológicas se define como necrosis (Figura 2).

En la necrosis la degeneración celular es pasiva, sin requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas, y en ella tiene lugar la pérdida aguda de la fisiología celular que conlleva a un proceso osmótico desmesurado que finaliza con la lisis de la membrana celular y la liberación del contenido intracelular. Este fenómeno conduce a la necrosis de las células vecinas mediante mecanismos directos e indirectos. Por ejemplo, enzimas

proteolíticas liberadas de los restos celulares pueden degradar proteínas de las membranas de células vecinas promoviendo su muerte por necrosis (Lorenz *et al.*, 2000). Adicionalmente, la liberación de factores pro-inflamatorios a consecuencia de la destrucción del tejido, atrae a células inmunes capaces de liberar enzimas proteolíticas y factores citotóxicos que promueven la muerte por necrosis y el proceso inflamatorio. Esto permite explicar el que en áreas donde se observan procesos inflamatorios y fibróticos sea frecuente encontrar células necróticas (Valesini *et al.*, 2004).

La apoptosis también se define como muerte celular programada. Este término griego que hace referencia a la caída natural de las hojas en las plantas, fue propuesto por Kerr y colaboradores (Granville *et al.*, 1998). La apoptosis es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución, desde nemátodos hasta mamíferos. Se describió inicialmente por sus características morfológicas, que incluyen la pérdida de los contactos intercelulares, la invaginación de la membrana citoplasmática, el encogimiento celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA y la posterior fragmentación celular en los llamados cuerpos apoptóticos (Korsmeyer, 1995). El número de células de un tejido está regulado tanto por factores que controlan la proliferación como la supervivencia celular (Thompson, 1995), lo que indica que la apoptosis está regulada genéticamente y que puede verse afectada por alteraciones genéticas. De hecho en numerosas patologías humanas, desde las enfermedades neurodegenerativas hasta el cáncer, pasando por las enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide), se han descrito alteraciones en las vías apoptóticas (Hetts, 1998).

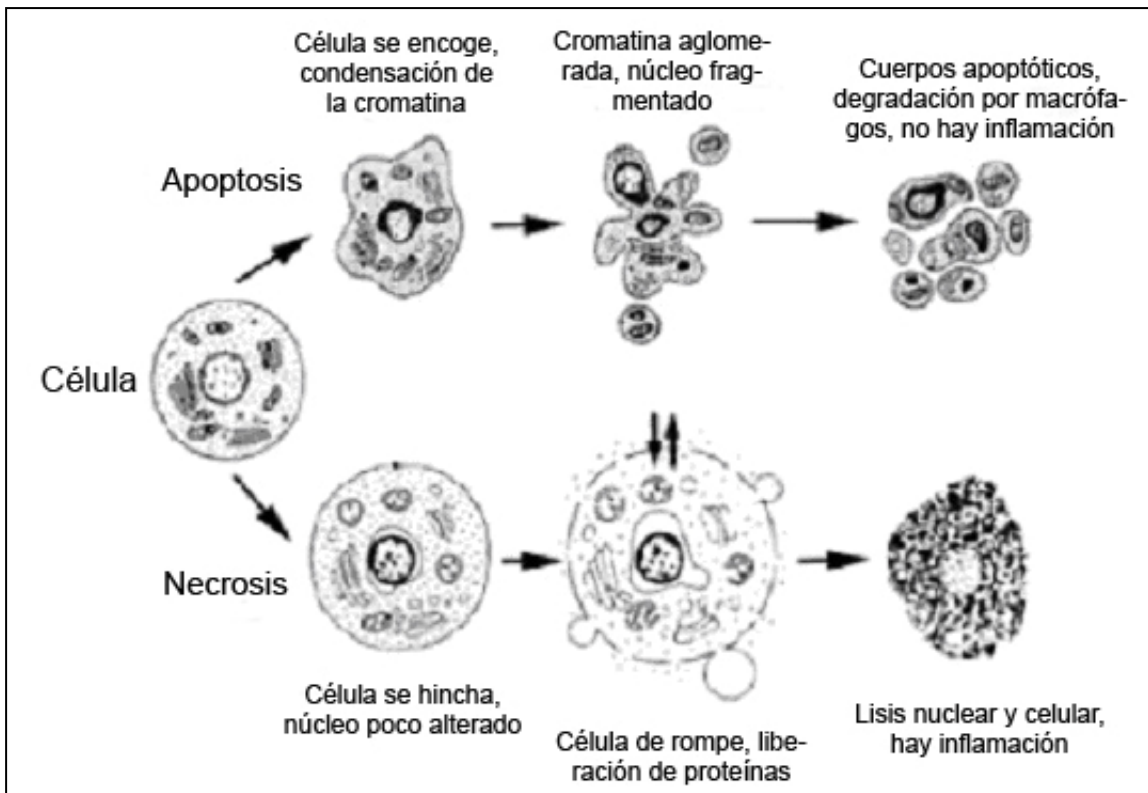


Figura 2: Tipos de muerte celular y sus características morfológicas.

El proceso apoptótico se puede dividir en tres fases funcionales diferentes: fase de iniciación, fase efectora y fase de degradación o ejecutora (Kroemer *et al.*, 1997).

Fase de iniciación: Se caracteriza por la participación de múltiples mecanismos activados por diversos factores que incluyen: la hipoxia, la radiación, la pérdida de interacción célula-matriz, la depleción de factores de crecimiento, o el “shock” térmico (Li y Yuan, 1999). La iniciación de la apoptosis por lo general define dos vías, la extrínseca y la intrínseca o mitocondrial. Una de las vías extrínsecas mejor caracterizadas es la activación de los llamados receptores de muerte. Estas moléculas pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), algunos de los mejor caracterizados como inductores de apoptosis son TNF-R, Fas (CD95), DR3, DR4 y DR5, entre otros (Ashkenazi y Dixit, 1998). Estos receptores tienen un dominio citosólico de muerte, o DD por sus siglas en inglés “Death Domain”, capaz de

interaccionar con la maquinaria apoptótica intracelular. Los receptores de muerte una vez activados por unión a su ligando específico, interaccionan a través del DD con moléculas adaptadoras que también contienen ese dominio, además de tener un dominio adicional para la inducción de muerte celular, conocido como dominio efector de muerte o DED (“Death Effector Domain”) (Berglund *et al.*, 2000). El dominio DED de las proteínas adaptadoras puede interaccionar con ciertos miembros de la familia de proteasas de cisteína conocidas como caspasas. Las caspasas iniciadoras también contienen dominios DED homólogos dentro de prodominios largos, e incluyen a las caspasas 8, 9 y 10 (Muzio *et al.*, 1998). La oligomerización de estas caspasas dentro del complejo del receptor de muerte, las activa por auto-degradación de su prodominio DED. La forma activa de las caspasas iniciadoras se libera al citosol donde procesan y activan a las caspasas efectoras (Slee *et al.*, 1999).

La vía intrínseca de activación se inicia por acción de factores capaces de producir mutaciones en el DNA (factores cancerígenos, radiaciones, NO, etc), esto involucra el aumento de la proteína p53 que se asocia a una detención del ciclo celular para favorecer la reparación de DNA dañado. En ausencia de dicha reparación se induce la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, además de la disminución en la síntesis de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL. El desbalance a favor de las proteínas pro-apoptóticas provoca cambios iónicos en la membrana de la matriz de la mitocondria que conlleva a la apertura del poro mitocondrial y al escape del citocromo c. El citocromo c permite la formación de complejos como el apoptosoma que junto con la procaspasa 9 y el factor activador de la apoptosis-1 (apaf-1), resultan en la activación de las caspasas efectoras que incluyen a las caspasas 3, 6 y 7 (Li y Yuan, 1999).

Fase efectora: A pesar de la gran variedad de estímulos que son capaces de inducir el programa de muerte celular, las diferentes señales convergen en la fase efectora, donde se determina si la célula entra o no en apoptosis. Esta fase se caracteriza, por estar regulada a nivel mitocondrial en la mayoría de los sistemas estudiados (Gross *et al.*, 1999). En esta regulación participan un gran número de factores pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 implicados en la regulación de la

función mitocondrial (Lowe y Lin, 2000). Todos los miembros de la familia comparten al menos 1 dominio de homología con Bcl-2 (Adams y Cory, 2001). Los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, Mcl-1, A1 y Boo conservan 4 dominios de homología (BH1 a BH4). El dominio BH4 es característico de los miembros que promueven la supervivencia celular (Reed, 1997). En cuanto a los miembros pro-apoptóticos como son Bax, Bak o Bad, su grado de conservación es menor, y precisamente son los que producen una caída del potencial transmembranal favoreciendo la liberación de citocromo c. Además, pueden interactuar con mecanismos de la vía extrínseca activada por los receptores de muerte.

Fase ejecutora o de manifestación de la apoptosis: Esta fase corresponde a la manifestación de las características bioquímicas y morfológicas propias de la apoptosis (Kroemer *et al.*, 1997). Algunos de los genes implicados en la fase ejecutora final de la apoptosis incluyen a aquellos responsables de la fragmentación del DNA (como ICAD y CAD), de la condensación de la cromatina (como acinus), de la invaginación de la membrana citoplasmática y del encogimiento celular (como laminina A, actina, Gas2, Fodrina y Rock-1).

La latencia de las diferentes fases varía entre los tipos celulares y el tipo de estímulo dado, pero en general se ha observado que los distintos tipos celulares comparten numerosas proteínas con propiedades pro y anti-apoptóticas cuya expresión puede ser activada e inhibida por señales intrínsecas o extrínsecas similares (Williams y Smith, 1993) (Figura 3).

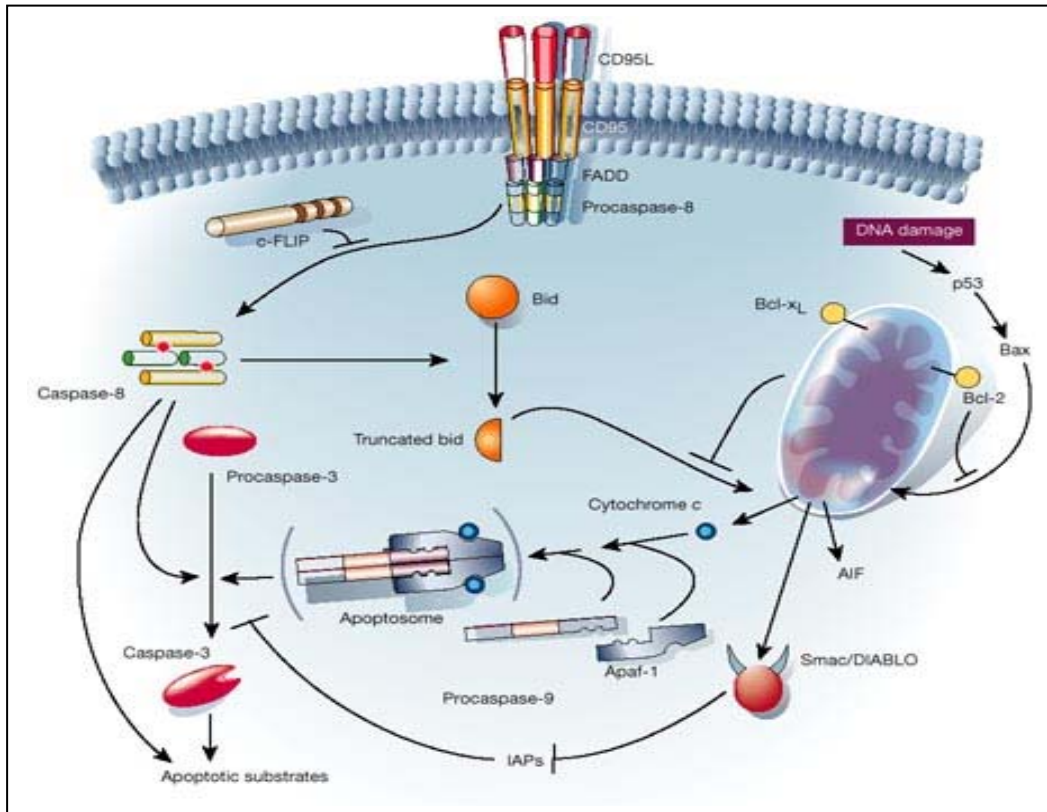


Figura 3: Vías principales de apoptosis en mamíferos, responsables de mediar la vía extrínseca y la intrínseca. CD95L (FasL), FADD / MORT-1 (Fas-associated death domain / mediator of receptor-induced toxicity-1), FLICE (FADDlike IL-1 β -converting enzyme), Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), cFLIP (FLICE/caspasa 8 Inhibitory Protein), Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), IAPs (inhibition of apoptosis proteins), AIF (apoptotic inducer factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI), AIF (Apoptosis-Inducing factor).

APOPTOSIS DEL CARTÍLAGO

Diversas evidencias apoyan la participación de la apoptosis en la patofisiología del cartílago articular. Por ejemplo, en la AR están presentes mecanismos tanto anabólicos como catabólicos responsables de inducir la degradación en el cartílago a través de estimular la apoptosis de los condrocitos, de acuerdo a métodos específicos para evaluar este proceso, vrg., tinción de anexina V que es una molécula que no es fácil de difundir a través de la membrana, presenta una alta afinidad por la fosfatidil serina, que es uno de los componentes que se expone al exterior cuando la célula está en apoptosis; además se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido (Alfaro *et al.*, 2000), análisis del potencial de membrana mitocondrial y la determinación de la fragmentación

de DNA por TUNEL, ELISA y citometría de flujo (Monfort *et al.*, 2006). En la OA la degradación y erosión del cartílago están mediadas por la liberación de factores catabólicos entre los que se pueden incluir a las citocinas vía la síntesis de proteasas como el plasminógeno y la plasmina, la reducción de procesos anabólicos de reparación y el decremento de la síntesis de componentes de la matriz extracelular como el colágeno II y el agregano. La consecuencia pro-apoptótica de estas alteraciones se ha detectado histológicamente (TUNEL, inmunohistoquímica para Bcl-2, Bax y Fas), y mediante el análisis electroforético del DNA (Mistry *et al.*, 2004), pero aún no son claros los mecanismos involucrados en estas respuestas.

La apoptosis ha sido más estudiada en la placa de crecimiento durante el proceso de osificación endocondral, mediante el cual ocurre la sustitución del cartílago avascular por el tejido óseo, uno de los tejidos más vascularizados del organismo. Los nuevos vasos sanguíneos traen consigo la eliminación del cartílago a través de activar la apoptosis de los condrocitos y la degradación de la matriz extracelular, lo que permite el crecimiento de los huesos largos (Gerber *et al.*, 1999; Zelzer *et al.*, 2004). La influencia de los vasos sanguíneos se atribuye a la hiperoxia (Hopf *et al.*, 2005), a los factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (Bluteau *et al.*, 2007) y al NO (Tamura *et al.*, 1996).

OXIDO NITRICO

El NO es un gas altamente reactivo con múltiples funciones en el organismo, entre las que sobresalen acciones sobre la neurotransmisión, el sistema cardiovascular y la inflamación. En el cartílago, el NO participa en el recambio de la matriz extracelular a través de inhibir la síntesis de los agreganos (Taskiran *et al.*, 1994), de inhibir los efectos anabólicos del TGF- β . (Studer *et al.*, 1999a) y de promover la actividad de las metaloproteasas de matriz (Murrell *et al.*, 1995). Además, se ha propuesto que el NO es un mediador de la destrucción del cartílago en la AR y en la OA a través de diferentes mecanismos (Blanco y Fernandez-Sueiro, 1998; Johnson *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 1998). El NO puede incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros factores

oxidantes (H_2O_2), inducir la mineralización del cartílago por medio de la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Johnson *et al.*, 2000), reducir la síntesis del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), inhibir la proliferación e inducir apoptosis (Stefanovic-Racic *et al.*, 1996; Pelletier *et al.*, 1996). Las acciones pro-apoptóticas del NO se han descrito en diversos tejidos y se asocian con sus niveles altos (Dawson y Dawson, 1994; Parkinson *et al.*, 1997). El líquido sinovial procedente de las articulaciones humanas sanas contiene valores muy bajos de NO, a diferencia del procedente de pacientes con OA o AR que posee altas concentraciones de NO (Farrel *et al.*, 1992). Además, la cantidad de NO producido por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de degradación del cartílago (Hashimoto *et al.*, 1998).

De los tejidos que forman parte de la articulación, el cartílago es el tejido que tiene mayor capacidad para sintetizar y liberar NO. Los condrocitos superficiales estimulados por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β producen más NO que las células de las capas más profundas (Hayashi *et al.*, 1997). En cambio, el tejido sinovial humano tiene una escasa capacidad para sintetizar y liberar NO (Rediske *et al.*, 1994).

La producción del NO resulta de la oxidación del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas llamadas en conjunto sintetasas de óxido nítrico (NOS). Aunque codificadas por genes diferentes, las NOS comparten entre sí un 50-60% de similitud en su secuencia nucleotídica y aminoacídica (Geller y Billiar, 1998), y en casos en los que estas isoformas han sido clonadas en más de una especie, el porcentaje de similitud encontrado entre las diferentes especies para una misma isoforma es de 90% (Geller y Billiar, 1998).

Se conocen tres isoformas de NOS, dos de éstas se expresan de forma constitutiva y se han denominado como neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) por su localización principal en las neuronas y en el endotelio vascular. La tercera isoforma no está presente en condiciones normales y su expresión es inducida (iNOS) principalmente por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α y el INF- γ (Studer *et al.*, 1999; Lotz, 1999). Las NOS difieren en la cantidad de NO que generan, mientras

la eNOS y la nNOS producen cantidades picomolares o nanomolares de NO, la iNOS produce cantidades micromolares. Las concentraciones micromolares de NO ejercen efectos antimicrobianos que pueden conducir a eventos inflamatorios crónicos. Los efectos inflamatorios del NO se asocian con la formación de radicales libres que llevan a la oxidación e inactivación de macromoléculas (proteínas y DNA), con la consecuente pérdida de funciones enzimáticas y la desintegración de la membrana plasmática así como la producción de mutaciones en el DNA (Eiserich *et al.*, 1998). Así, se ha propuesto que el NO activa la vía pro-apoptótica intrínseca en varios tipos celulares (Dawson y Dawson, 1996; Bao *et al.*, 2007; Bolanos *et al.*, 1995).

La participación del NO en la apoptosis del cartílago se ha apoyado en estudios que muestran que el aumento en NO inducido por un donador de NO (nitroprusiato de sodio) estimula la apoptosis de condrocitos en cultivo (Blanco *et al.*, 1995). Además, se ha mostrado que una línea derivada de condrocitos artrósicos expresan a la iNOS (RNAm y proteína) y producen NO de forma espontánea (Amin *et al.*, 1997) y que el cartílago artrósico expresa iNOS y produce NO en cultivo (Rediske *et al.*, 1994). Cabe mencionar que el cartílago articular normal no produce NO ni expresa a la iNOS, a menos de que se estimule con citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α responsables de mediar los procesos inflamatorios asociados con la destrucción del cartílago (Pelletier *et al.*, 1996). En su conjunto, estos hallazgos indican que en el cartílago artrósico existen factores capaces de inducir la síntesis de NO. Dichos estímulos podrían incluir: a) citocinas o factores de crecimiento producidos por los condrocitos; b) la acción de componentes de la matriz extracelular (fibronectina), y c) presencia en el líquido sinovial de factores provenientes de otras células de la articulación (células sinoviales) o de la circulación (células inmunes).

Diversas evidencias sugieren que la PRL y sus derivados, las vasoinhibinas, pueden actuar como reguladores de la supervivencia de los condrocitos articulares.

PROLACTINA Y VASOINHIBINAS

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada por la glándula pituitaria anterior cuyo nombre se deriva de su acción sobre la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, además de sus efectos sobre la lactancia, la PRL ejerce una multiplicidad de efectos que se incluyen dentro de la osmorregulación, la regulación de la reproducción, el crecimiento, la respuesta inmune y la angiogénesis (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). Esta diversidad funcional parece depender de la producción de la PRL por distintos tipos celulares, de la heterogeneidad molecular de sus receptores que le permiten acoplarse a diversas vías de señalización, así como de la modificación de la hormona hacia variantes moleculares con diferentes actividades biológicas (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

La PRL se origina a partir de un solo gen que se encuentra presente en todos los vertebrados y que da origen a una proteína madura de aproximadamente 200 aminoácidos, con una masa molecular de 23 kDa (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Bole-Feysot *et al.*, 1998). Esta proteína sufre modificaciones pos-traduccionales del tipo de la fosforilación, glicosilación y proteólisis (Sinha, 1995) que le confieren diferentes propiedades biológicas. Por ejemplo, la fosforilación puede generar antagonistas de la hormona (Wang y Walter, 1993), mientras que la glicosilación (Hoffman *et al.*, 1993) y la proteólisis (Anthony y Powers, 1993; Clapp *et al.*, 1989) se traducen en variantes de PRL con una menor actividad hormonal mitogénica y lactogénica. Si bien los fragmentos amino-terminales de la PRL denominados recientemente como vasoINHIBINAS (Clapp *et al.*, 2006) funcionan como agonistas parciales del receptor de la PRL (Clapp *et al.*, 1989), su relevancia funcional radica principalmente en que estos péptidos ejercen efectos distintos e incluso antagónicos a los de la PRL. Estos efectos incluyen la inhibición de la angiogénesis (Corbacho *et al.*, 2002; Clapp *et al.*, 2006) y la estimulación de la expresión de la iNOS vía la activación de nuevos receptores (Corbacho *et al.*, 2000).

Las vasoinhibinas se producen por la acción de proteasas del tipo de la catepsina-D (Baldocchi *et al.* 1993) y por metaloproteasas de matriz (Macotella *et al.*, 2006), y están presentes en la circulación en la hipófisis anterior (Torner *et al.*, 1995) y en diferentes tejidos extrahipofisarios, incluyendo el endotelio de diversos lechos vasculares (Corbacho *et al.*, 2000), los fibroblastos (Corbacho *et al.*, 2000), el tejido nervioso (Clapp *et al.*, 1994), la retina (Aranda *et al.*, 2005) y el cartílago (Macotella *et al.*, 2006), entre otros. Las vasoinhibinas reducen la proliferación (Clapp *et al.*, 1993) y la producción de proteasas (Lee *et al.*, 1998) por las células endoteliales y estimulan la apoptosis de las mismas (Martini *et al.*, 2000). Dado que la PRL no inhibe la angiogénesis, se propuso que los efectos de las vasoinhibinas son mediados vía un receptor distinto al receptor de la PRL (Corbacho *et al.*, 2002). En apoyo a esta propuesta, se mostró que las células endoteliales de capilares del cerebro bovino contienen sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad para las vasoinhibinas ($K_d = 1 \text{ nM}$) pero que no se unen a la PRL y que podrían representar los receptores específicos de esta familia de péptidos (Clapp y Weiner, 1992).

Mientras que los efectos antiangiogénicos de las vasoinhibinas están bien documentados, el papel de la PRL en la angiogénesis es poco conocido. Si bien es claro que la PRL no inhibe la angiogénesis, se ha reportado que puede estimular dicho proceso en el modelo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Struman *et al.*, 1999). Sin embargo, este efecto aún es controversial como también lo es si la PRL tiene acciones directas sobre las células endoteliales. Si bien los estudios iniciales no lograron obtener evidencias de la presencia del receptor de PRL en las células endoteliales (Clapp y Weiner 1992), posteriormente se le detectó en diversos lechos vasculares en muy bajas concentraciones (Merkle *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2006; Ricken *et al.*, 2007).

Por otra parte, tanto la PRL como las vasoinhibinas ejercen efectos opuestos sobre la expresión de la iNOS en fibroblastos de pulmón, que son células determinantes de procesos inflamatorios en las vías respiratorias. Las vasoinhibinas inducen la expresión de la iNOS con una potencia similar a la combinación de tres citocinas pro-inflamatorias (IL- 1β , INF- γ y TNF- α) y esta acción resulta en la producción de altas concentraciones de NO

(Corbacho *et al.*, 2000). Además, los fibroblastos también expresan sitios de unión específicos y de alta afinidad para vasoinhibinas (Corbacho *et al.*, 2000). En contraposición, la PRL inhibe la producción de NO inducida por citocinas pro-inflamatorias y no modifica la producción basal de NO (Corbacho *et al.*, 2003).

El hecho de que la PRL y las vasoinhibinas regulen la producción de NO vía la expresión de iNOS y, por otra parte, que la actividad de iNOS se encuentre íntimamente ligada con la apoptosis de los condrocitos, sugiere que las prolactinas podrían actuar como moduladoras de este proceso en el cartílago.

PRL, VASOINHIBINAS Y CARTÍLAGO

Diversas evidencias han involucrado a la PRL con la funcionalidad del cartílago. Por ejemplo, se ha sugerido su participación en el desarrollo del cartílago ya que el receptor de la PRL se expresa en el cartílago murino y humano durante la gestación (Tzeng y Linzer, 1997; Freemark *et al.*, 1997). Además, la PRL se expresa en células madre derivadas de la médula ósea, cuando se induce su diferenciación a condrocitos; y en estas condiciones, la PRL estimula la producción de colágena II, de proteoglicanos y su propia expresión (Ogueta *et al.*, 2002). Además, la PRL en combinación con glucocorticoides induce la organización de los condrocitos en columnas longitudinales y por lo tanto la posible formación y reparación del cartílago y el hueso (Ogueta *et al.*, 2002).

Por otra parte, la PRL se ha asociado también con procesos patológicos de la articulación. Se han reportado niveles altos de PRL en el suero de pacientes con AR (Mateo *et al.*, 1998; Seriola *et al.*, 2002). También se ha encontrado que el tejido sinovial de los pacientes con AR expresa el RNA mensajero de la PRL (Nagafuchi *et al.*, 1999); que la PRL está presente en el líquido sinovial de pacientes con sinovitis y AR (Ogueta *et al.*, 2002), y que el receptor de PRL se expresa en el cartílago de pacientes con osteoartritis (Ogueta *et al.*, 2002). Más aún, algunas evidencias sugieren que la

hiperprolactinemia podría participar en el daño articular. La PRL induce la proliferación de células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, y esta hormona actúa sobre tipos celulares de la articulación artrítica estimulando la producción de citocinas (IL-6 e IL-8) y de la MMP-3, además de inhibir la producción del inhibidor de MMP tipo 1 (TIMP-1) (Nagafuchi *et al.*, 1999).

En un estudio reciente en nuestro laboratorio, se reportó la expresión del RNA mensajero de la PRL y de su receptor en cultivos primarios de condrocitos aislados de la articulación femoro-tibial de la rata (Macotella *et al.*, 2006). Además, se mostró que los condrocitos secretan vasoinhibinas biológicamente activas al medio de cultivo, y que este tipo celular sobresale en su capacidad de generar vasoinhibinas a partir de PRL (Macotella *et al.*, 2006). En efecto, MMP secretadas por los condrocitos procesan a la PRL hacia vasoinhibinas de 14, 16 y 17 kDa en concentraciones 10 a 1000 veces menores que en fibroblastos, líneas celulares de linfoma (U937) y de carcinoma de pulmón (A549) (Macotella *et al.*, 2006). Estos hallazgos apoyan la posible participación de la PRL y de las vasoinhibinas en la regulación autócrina del cartílago.

En apoyo a la significancia funcional de la PRL, se observó que esta hormona inhibe la apoptosis de los condrocitos en cultivo, inducida por la deprivación de suero y evaluada por tres diferentes metodologías que determinan la fragmentación del DNA (TUNEL, ELISA y citometría de flujo) (Zermeño *et al.*, 2006). Consistentemente con esta acción, se demostró que el receptor de la PRL está presente en estas células (Macotella *et al.*, 2006). En base a estos estudios fue posible proponer que la PRL constituye un factor de supervivencia para los condrocitos, y por ende que esta hormona posee implicaciones potenciales para la preservación del cartílago en condiciones patológicas, hipótesis que se está investigando muy activamente en nuestro laboratorio.

Sin embargo, se desconoce si las vasoinhibinas pueden regular autócrinamente la función de los condrocitos. Dado que estos péptidos tienen acciones opuestas a la PRL sobre la expresión de la iNOS, y que el NO promueve la apoptosis de los condrocitos en este trabajo investigamos si las vasoinhibinas estimulan la apoptosis de este tipo celular

y por ende podrían participar en la regulación de este proceso en el cartílago. Al respecto, cabe mencionar que las vaso-inhibinas promueven la apoptosis de las células endoteliales a través de activar a las caspasas 8, 9 y 3 (Tabruyn *et al.*, 2003) e inducir la conversión del factor Bcl-X, de su forma anti-apoptótica Bcl-X_L a su forma pro-apoptótica Bcl-X_S (Martini *et al.*, 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La apoptosis de los condrocitos forma parte del proceso de destrucción del cartílago articular, característico de la osificación endocondral y de las enfermedades artríticas. El NO es uno de los factores determinantes de la apoptosis de los condrocitos en la artritis reumatoide y la osteoartritis. Dado que: (1) los condrocitos del cartílago articular producen PRL y la procesan a vasoinhibinas; (2) la PRL inhibe y las vasoinhibinas estimulan la producción de NO en diversos tipos celulares; y (3) la PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos, en este proyecto investigamos si las vasoinhibinas promueven la apoptosis de los condrocitos vía la estimulación de la producción de NO.

HIPOTESIS

Las vasoinhibinas promueven la apoptosis de los condrocitos y esta acción se relaciona con la estimulación de la producción de NO por estas células.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto de las vasoinhibinas sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo.
2. Determinar el efecto de las vasoinhibinas sobre la producción de NO por condrocitos en cultivo.
3. Determinar si donadores de NO (nitroprusiato de sodio) y la combinación de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , INF- γ y TNF- α) estimulan la apoptosis de condrocitos en cultivo.

METODOLOGÍA

Vasoinhibinas. La PRL de rata se adquirió del “National Hormone and Pituitary Program” de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NHPP, NIH, Torrance, CA). Las vasoinhibinas se generaron mediante la proteólisis enzimática de la PRL de rata (16 kDa) o por mutagénesis dirigida del DNA complementario de la PRL humana (14 kDa), de acuerdo a los procedimientos descritos previamente (Clapp, 1987; Galfione *et al.*, 2003).

Aislamiento y cultivo de condrocitos. El cartílago se obtuvo de la superficie de las placas tibiales y de los cóndilos femorales de ratas Wistar machos de 120-150 g. Se utilizaron aproximadamente 10 ratas Wistar de las que se obtuvieron aproximadamente 10×10^6 condrocitos. Para dicho aislamiento, el tejido se cortó en pequeños fragmentos y se puso a digerir con tripsina al 0.025% en solución A pH 7.37 (1.8g glucosa, 0.220g KCl, 7.590g NaCl, 0.745g Na₂HPO₄, en 1 L de agua) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente el extracto se centrifugó durante 10 min a 134 g y el “pellet” se incubó con colagenasa tipo 2 al 0.02% en solución A pH 7.37 (1.8g glucosa, 0.220g KCl, 7.590g NaCl, 0.745g Na₂HPO₄, en 1 L de agua) en agitación a 37°C durante 2 h. Los agregados celulares residuales se extrajeron por sedimentación después de una centrifugación por 10 min a 134 g y las células se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, BRL) y se cultivaron a 37°C bajo una atmósfera de 95% aire/ 5% de CO₂.

Evaluación de la apoptosis *in vitro*. Los condrocitos se sembraron a una densidad de 200,000/pozo (caja de 48 pozos), y se incubaron por 24 h en 10% SFB para posteriormente cultivarlos en presencia o ausencia de dosis variables de vasoinhibinas (1-100 nM) por 24 ó 48 h. En otros experimentos se evaluó el efecto de una mezcla de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , INF- γ y TNF- α , (que forman parte de los principales mediadores en la destrucción del cartílago) a concentraciones de 5 ng/ml, 100 U/ml y 25 ng/ml (R&D Systems Inc, Minenapolis,

MN) respectivamente, o de un donador de NO [1 mM o 2 mM NPS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)].

Detección de Muerte Celular por el Ensayo ELISA. Se utilizó un inmunoensayo enzimático (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) diseñado para valorar cuantitativamente el DNA fragmentado asociado a histonas. Dicho estuche fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, en una caja de ELISA (96 pozos) se pusieron 50 μ l/pozo de solución de cubrimiento (anticuerpo anti-histona capaz de reconocer a las histonas que quedan descubiertas debido a la degradación del DNA), y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. La solución se retiró y en su lugar se pusieron 100 μ l/pozo de la solución de incubación proveída en el estuche, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de incubación se sustituyó por 50 μ l de la muestra de extractos de condrocitos/pozo (1:10). Adicionalmente, para determinar el ruido del fondo se pusieron 50 μ l/pozo de solución de incubación en 2 pozos y se incubaron por 90 minutos a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron tres veces con solución de lavado, se agregaron 50 μ l de anti-DNA/pozo y se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente, se lavó de nuevo con solución de lavado por tres veces, y se pusieron 50 μ l de sustrato/pozo incubándose en agitación a 6 g, hasta observar color (15 minutos). La solución se mezcló con movimientos suaves y la densidad óptica se midió a 405 nm y 490 nm contra la solución del sustrato. Los datos obtenidos se expresan como factor de enriquecimiento que se obtiene restando la absorbancia de 490 nm a la de 405 nm de cada una de las muestras y normalizando con el control. Sin embargo, para fines prácticos nosotros nos referiremos al factor de enriquecimiento como apoptosis.

Evaluación de NO. Se analizaron los efectos de las vaso-inhibinas, de donadores de NO (NPS) o de la mezcla de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , INF- γ y TNF- α) sobre la producción de NO en condrocitos en cultivo. La producción de NO se determinó en los medios condicionados de los condrocitos sometidos a los

diferentes tratamientos mediante la reacción de Griess que mide los productos estables de la oxidación del NO (nitratos y nitritos) de acuerdo al método utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio (Corbacho *et al.*, 2000). Brevemente, se elaboró una curva de calibración poniendo 100 μ l de SFB al 10% y diferentes diluciones de NO₃ en 100 μ l. Se preparó una solución “stock” de la siguiente manera: 50% HEPES pH 7.5, 25 % FA (formato de amonio 2.4 M pH 7.2) y 25% de agua destilada. Se agregaron 50 μ l de reductasa de *E. coli* por cada 2 ml de solución “stock”. 100 μ l de cada medio condicionado o de las diluciones de la curva patrón se mezclaron con 100 μ l de la solución “stock” y se incubaron por una hora a 37°C para posteriormente centrifugarlos por 3 min a 15,682 g. Se tomaron 100 μ l de los sobrenadantes, se les agregó 100 μ l del reactivo de Griess (1g sulfanilamida, 0.1g NEDA, 2.94 ml de ácido fosfórico, en 100 ml de agua destilada), se colocaron en una placa de 96 pozos y se determinó la densidad óptica a 490 nm.

Aislamiento de RNA, RT-PCR y qPCR. El RNA de los condrocitos se extrajo usando el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El RNA total (5 μ g) fue retrotranscrito utilizando la enzima retrotranscriptasa M-MLV [Moloney murine leukemia virus] (Promega Madison, WI) y oligo (dT 16) (New England Biolabs). Después de la retrotranscripción, alícuotas de 2 μ l fueron usadas para la amplificación del cDNA por PCR tiempo real usando un equipo LightCycler™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN., USA) y SYBR green (Epicentre Technologies, Madison, WI., USA). Para la amplificación de p53 se utilizaron los siguientes oligos de secuencia específica: sentido AGA GAC CCA GCA ACT ACC AAC C, y antisentido CTC AGA CTG ACA GCC TCT GCA T, que generan un producto de 216 pb. La reacción incluyó un primer segmento 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. De igual manera se utilizaron alícuotas de 2 μ l de los productos de retrotranscripción obtenidos del RNA de condrocitos, para amplificar el cDNA de colágena II por PCR, usando un equipo Perkin Elmer (Gene Amp, PCR System 2400) y se utilizaron los oligos de

secuencia específica: sentido CAA GGG AGA CAG AGG TGA TGT, y antisentido TCT GTC CAG CTT CTC CTT GAT, que generan un producto de 287 pb. La reacción incluyó un primer segmento de (30 seg a 94°C) y 35 ciclos de amplificación (30 seg a 94°C, 30 seg a 60.4 °C y 30 seg a 72°C). Se usó como control de carga a la proteína estructural actina con la siguiente secuencia específica: sentido CCA TCA TGA AGT GTG ACG TTG, y antisentido ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA, que generan un producto de 175 pb.

RESULTADOS

Valoración de la diferenciación de condrocitos en cultivo

Diversos reportes alertan sobre la posible desdiferenciación de condrocitos en cultivo, la cual es factible controlar conservando una alta densidad de los cultivos (Isogai *et al.*, 2006), que es el método empleado en este estudio. Para validar el estado diferenciado de los condrocitos empleados en nuestro trabajo analizamos la expresión de colágena tipo II que es un marcador del estado diferenciado de este tipo celular. La amplificación por RT-PCR del RNA mensajero de dos preparaciones independientes de condrocitos cultivados en presencia de suero normal (10%) o de bajo suero (0.5%) durante 48 h, mostró un transcrito del tamaño esperado (287 pb) para el RNA mensajero que codifica para la colágena tipo II (Figura 4).

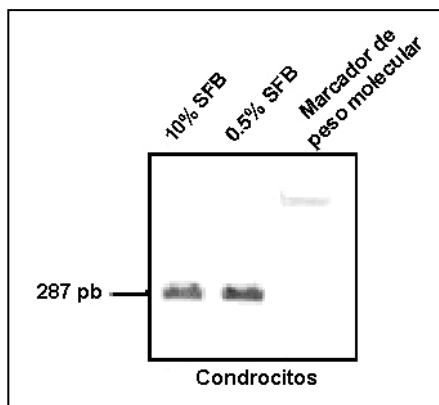


Figura 4: Productos de RT-PCR para colágena II, amplificados a partir del RNA total aislado de condrocitos cultivados en 10% o en 0.5% de SFB por 48 horas.

Efecto de vaso inhibinas sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo.

Cultivos primarios de condrocitos articulares recién aislados fueron incubados en 10% y 0.5% de SFB en presencia o ausencia de dosis crecientes (1-100 nM) de vaso inhibinas recombinantes de origen humano. Al cabo de la incubación de 48 h, se determinó la apoptosis de las células adheridas y presentes

en el medio de cultivo a través de evaluar la fragmentación del DNA con el ensayo ELISA específico. En la figura 5 se muestra que la privación de suero aumenta alrededor de 5 veces el nivel de apoptosis que se observa en presencia de 10% de suero. Esta observación valida nuestro ensayo para detectar apoptosis ante un conocido inductor de este proceso. Las vasoINHIBINAS inhibieron la apoptosis basal en su concentración más alta, e inhibieron la apoptosis inducida por 0.5% de suero en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, en 10% de suero el número total de células disminuyó en presencia de vasoINHIBINAS a niveles comparables a los observados bajo 0.5% de suero. Esta disminución sugiere que las vasoINHIBINAS inducen la muerte celular en un período previo a las 48 h, y por ende, la posible existencia de un efecto pro-apoptótico temprano de las vasoINHIBINAS.

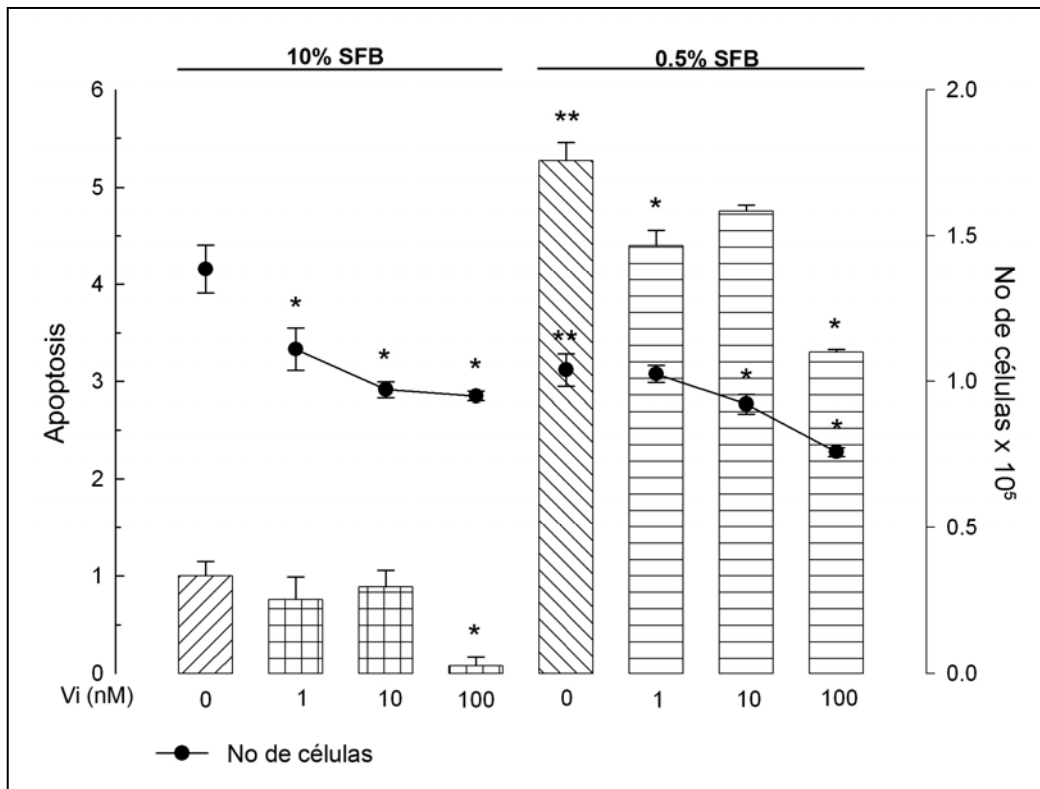


Figura 5: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 48 h a 10% y 0.5% de SFB y a concentraciones 1, 10 y 100 nM de vasoINHIBINA recombinante. La apoptosis se evaluó mediante la fragmentación de DNA con el ensayo de ELISA específico (factor de enriquecimiento = apoptosis), las células se contaron con un hemocitómetro. Los datos representan tres experimentos con tres repeticiones \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control sin vasoINHIBINAS. ** $p < 0.05$ vs control (10 % SFB).

Para valorar la especificidad de los efectos de las vasoinhibinas, utilizamos una preparación diferente de éstas, que fue generada mediante la proteólisis enzimática de la PRL de rata (Clapp, 1987) e incubamos a los condrocitos bajo condiciones de alto suero por 48 horas (Figura 6). En este experimento al igual que en el anterior se observó que las vasoinhibinas inhiben la apoptosis basal, pero a diferencia de las vasoinhibinas recombinantes el efecto se observó con todas las dosis utilizadas. Por otra parte y en apoyo al posible efecto pro-apoptótico temprano, se volvió a observar una disminución en el número total de células en presencia de las vasoinhibinas (Figura 5).

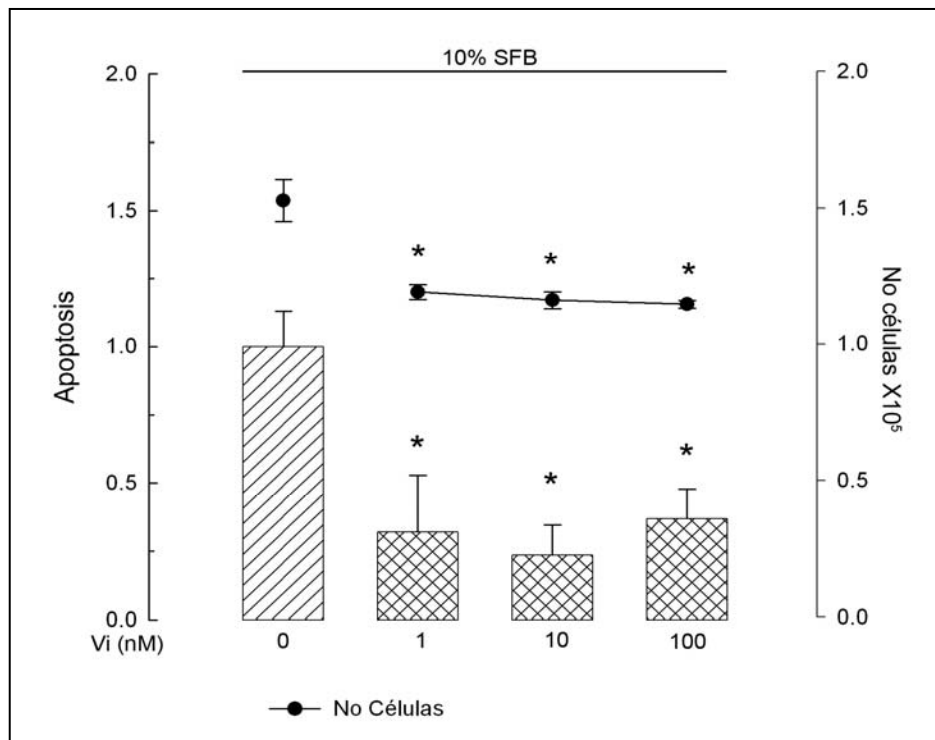


Figura 6: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 48 h a 10% de SFB y a concentraciones 1, 10 y 100 nM de vasoinhibinas generadas por proteólisis enzimática. La apoptosis se evaluó mediante la fragmentación de DNA con el ensayo de ELISA específico (factor de enriquecimiento = Apoptosis) y las células se contaron con un hemocitómetro. Los datos representan un experimento con tres repeticiones \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control.

Para investigar un posible efecto pro-apoptótico temprano de las vasoinhibinas decidimos probar si las vasoinhibinas recombinante y generada mediante proteólisis, estimulan la apoptosis de los condrocitos en un período más corto (24 h) de incubación (Figura 7). Encontramos que en este tiempo de

tratamiento, todas las dosis empleadas de ambos tipos de vasoinhibinas (recombinante y proteólisis enzimática) estimularon la apoptosis. Sin embargo, el número celular no se modificó bajo el tratamiento con vasoinhibinas generadas por proteólisis e incluso se llegó a incrementar ligeramente con algunas concentraciones de las vasoinhibinas recombinantes. Estos hallazgos indican que las vasoinhibinas son pro-apoptóticas y que el efecto sobre la fragmentación del DNA antecede al efecto sobre el número celular. Más aún, el efecto de ambas vasoinhibinas fue dependiente de la dosis, si bien las dosis más bajas de las vasoinhibinas recombinantes tuvieron un efecto mayor que las generadas enzimáticamente. La aparente mayor potencia de las vasoinhibinas recombinantes, si bien no fue congruente con los experimentos mostrados en la figura 5, se corroboró en todos los experimentos posteriores.

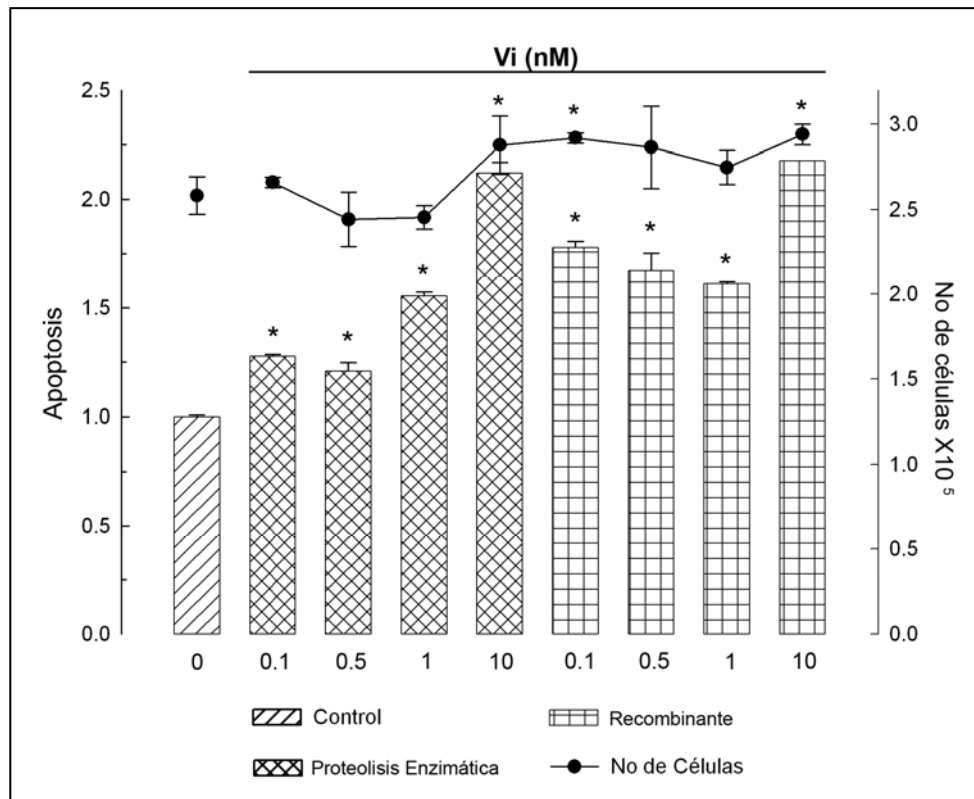


Figura 7: Cultivos de condrocitos fueron expuestos durante 24 h a 10% de SFB y a concentraciones variables de vasoinhibinas, recombinante y generada por proteólisis enzimática. La apoptosis y las células se evaluaron como en la figura 5. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan promedios \pm SEM de tres réplicas. * $p < 0.05$ vs control sin vasoinhibinas.

Expresión de p53 en condrocitos en cultivo.

El aumento de la proteína p53 es uno de los principales mecanismos capaz de detener el ciclo celular para favorecer la reparación de DNA dañado o la apoptosis de diferentes células (Wosik *et al.*, 2003). La cuantificación por RT-PCR en tiempo real del RNA mensajero para p53 se llevó a cabo en condrocitos cultivados en condiciones de privación de suero (0.5% SFB) o con 10% de suero en presencia de citocinas pro-inflamatorias o de vasoinhibina (Figura 8). En todos los casos se observó un aumento en la expresión de p53 con respecto al valor control del grupo incubado en presencia de 10% de suero en ausencia de los diferentes tratamientos. El mayor efecto lo tuvo la privación de suero, seguido del observado bajo la acción de vasoinhibinas y subsecuentemente de las citocinas pro-inflamatorias.

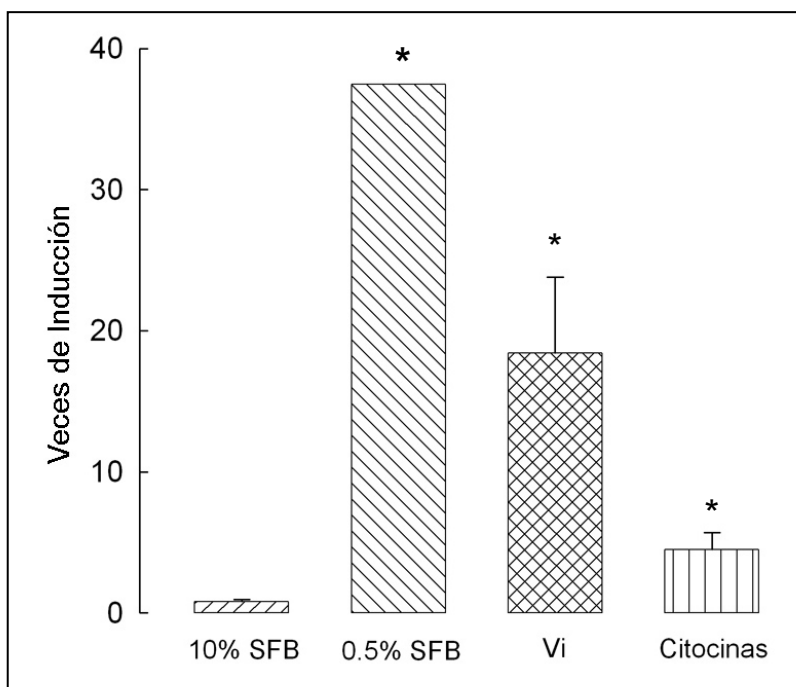


Figura 8: Productos de RT-PCR para p53, amplificados a partir del RNA total aislado de condrocitos cultivados en 10% de SFB, privación de suero (0.5%), vasoinhibinas (10 nM) y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e INF- γ), durante 24 h. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs 10% SFB.

Efecto de vasoinhibinas sobre la producción de NO por condrocitos en cultivo.

El efecto de las vasoinhibinas se evaluó sobre los niveles de NO en el medio de los condrocitos. No se observaron cambios significativos en la concentración de NO ni a las 48 h (Figura 9) ni a las 24 h (Figura 10) de cultivo. Esto indica que las vasoinhibinas no modifican la producción de NO en los condrocitos y por lo tanto que su efecto pro-apoptótico no involucra al NO.

De manera interesante, también bajo privación de suero, un estímulo que induce apoptosis, no se observó un aumento en NO, lo que nos llevó a documentar si el NO es estímulo suficiente para inducir la apoptosis de los condrocitos.

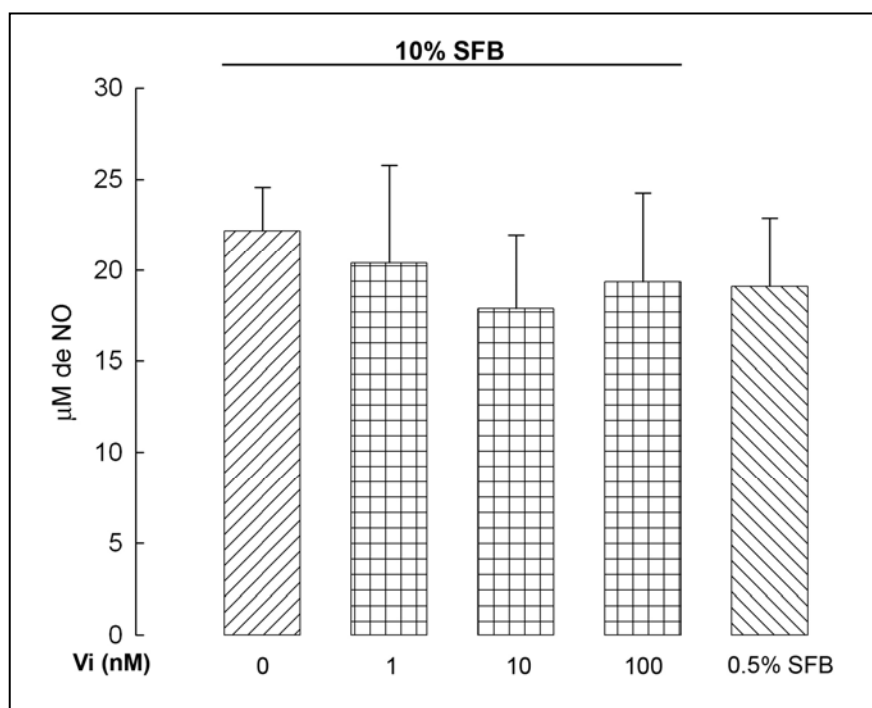


Figura 9: Producción de NO en cultivos de condrocitos expuestos durante 48 h a concentraciones variables (1, 10 y 100 nM) de vasoinhibinas recombinantes. La producción de NO se evaluó en el medio condicionado de condrocitos con el método de Griess que mide los productos estables de la oxidación de NO (nitritos y nitratos) Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes con tres réplicas.

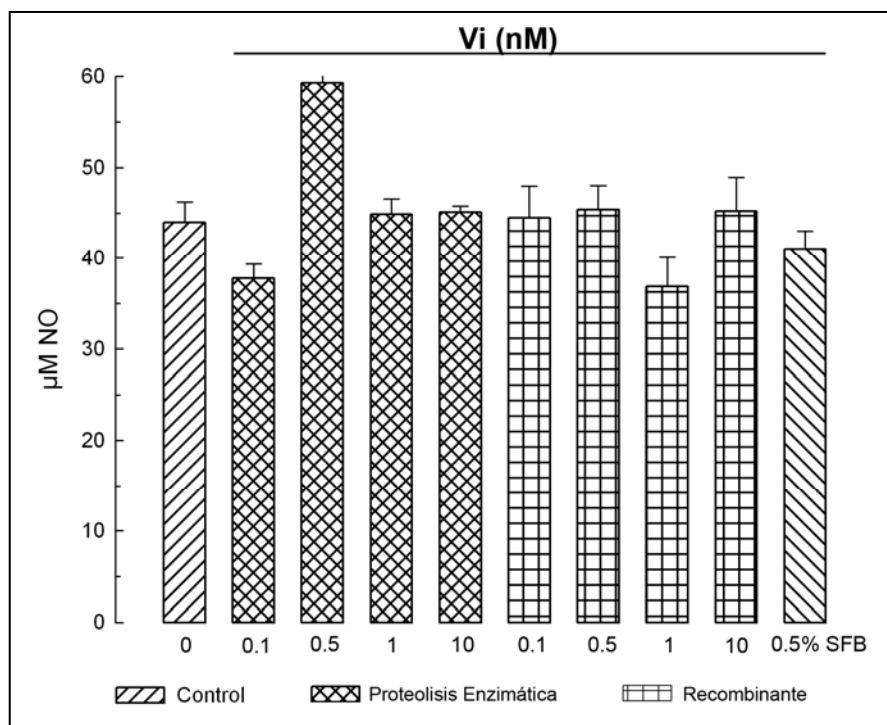


Figura 10: Producción de NO en cultivos de condrocitos expuestos a concentraciones variables de vasoinhibinas recombinantes y generadas por proteólisis enzimática durante 24 h. La producción de NO se evaluó como en la figura 9. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y representan promedios \pm SEM de tres réplicas.

Efecto del NO sobre la apoptosis de condrocitos en cultivo.

Con el propósito de documentar si el aumento en los niveles del NO es señal suficiente para disparar la apoptosis de los condrocitos, investigamos el efecto pro-apoptótico del NO sobre condrocitos en cultivo, ya sea por la respuesta a un donador de NO como el nitroprusiato de sodio (NPS) o bien por la mezcla de las citocinas pro-inflamatorias, IL-1 β , INF- γ y TNF- α .

Los condrocitos fueron incubados con dos dosis de NPS durante 24 h (Figura 11). Este tratamiento resultó en un aumento dosis-dependiente de la producción de NO y en una inhibición del número celular, donde la dosis más alta condujo a la desaparición total de las células. Mientras que con la dosis menor de NPS se incrementó la apoptosis significativamente con respecto al control. Estos resultados indican que el aumento de NO induce apoptosis, pero puede también derivar en la muerte celular total posiblemente por necrosis. Con el objeto de

estimular la producción de NO en condiciones más parecidas a las que tienen lugar en el organismo, se expuso a los condrocitos a la mezcla de citocinas pro-inflamatorias usada en los experimentos anteriores y que se sabe media reacciones inflamatorias de la articulación vía la producción de NO (Hayashi *et al.*, 1997).

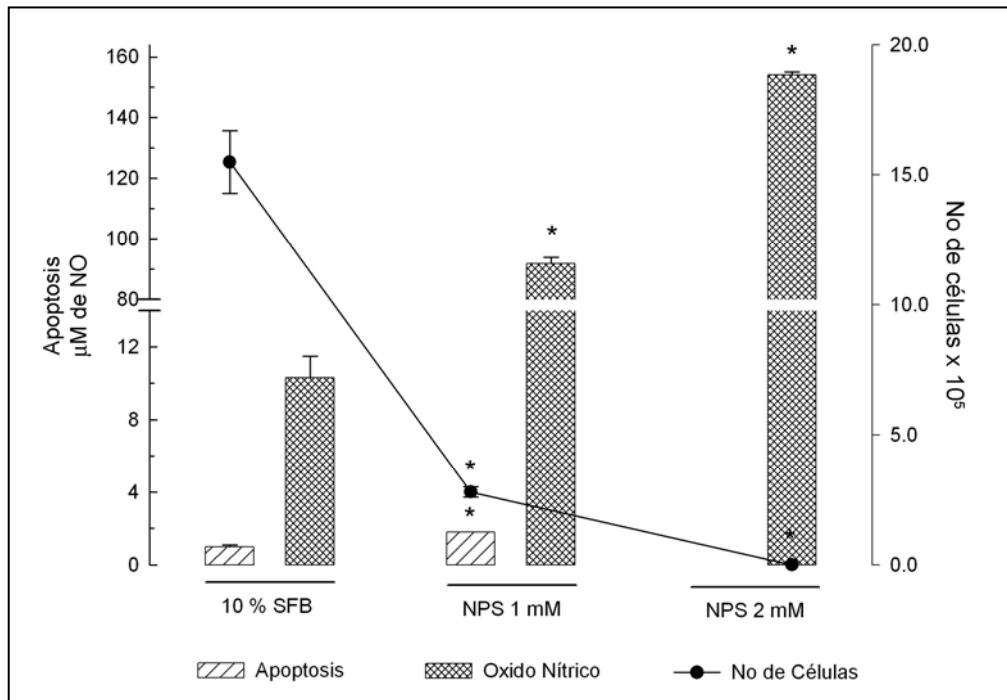


Figura 11: Efecto de incubar durante 24 h a condrocitos en 10% de suero en presencia y ausencia del donador de NO, nitroprusiato de sodio (NPS). La apoptosis y el número de células se evaluaron como en la figura 5 y la producción de NO se evaluó con el método mencionado en la figura 9. Los datos representan un experimento con tres repeticiones \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al control de 10 % de suero.

El tratamiento por 24 horas con las citocinas pro-inflamatorias aumentó tanto el NO, como la apoptosis, y disminuyó el número celular (Figura 12). Estas observaciones indican que el aumento en NO exógeno o inducido por acción de las citocinas pro-inflamatorias participa en la inducción de la muerte celular por apoptosis.

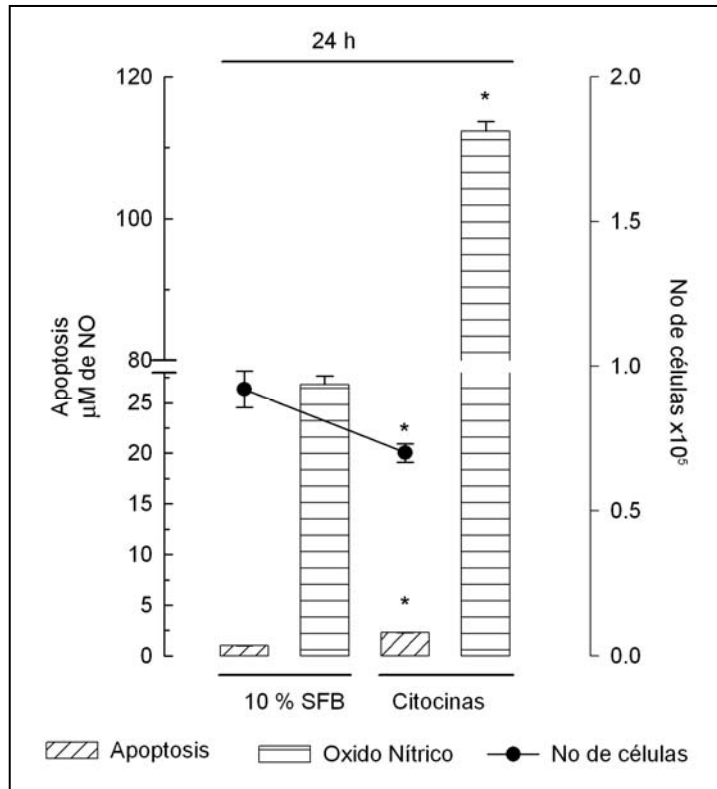


Figura 12: Condrocitos en cultivo expuestos a una mezcla de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , INF- γ y TNF- α , en 10 % de suero, durante 24 h. La apoptosis y el número de células se evaluaron como en la figura 5 y la producción de NO se evaluó con el método mencionado en la figura 9. Los datos representan tres experimentos independientes y son el promedio \pm SEM de tres réplicas. * $p < 0.05$ con respecto al control sin citocinas.

Sin embargo y en apoyo a que el NO no es un mediador esencial de la apoptosis de los condrocitos, encontramos que la privación de suero no afecta la síntesis de NO en los cultivos después de 24 ó 48 h de incubación, pero sí estimula la apoptosis y reduce el número celular en ambos tiempos (Figura 13). De acuerdo a estas observaciones el NO no parece mediar la apoptosis de los condrocitos inducida por las vasoinhibinas ni por la privación de suero.

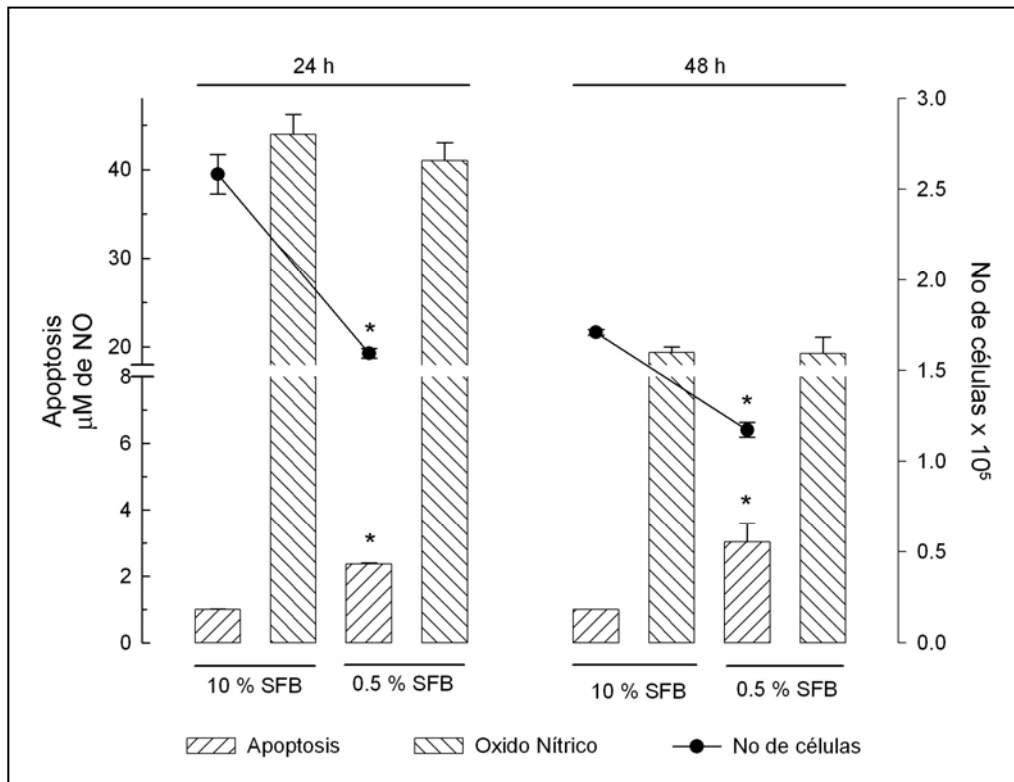


Figura 13: Comparación de la producción de NO, la apoptosis, y el número de condrocitos incubados en 10% o en 0.5% de SFB durante 24 y 48 h. La apoptosis y el número de células se evaluaron como en la figura 5 y la producción de NO se evaluó con el método mencionado en la figura 9. Los datos representan tres experimentos independientes y son el promedio \pm SEM de tres réplicas. * $p < 0.05$ con respecto al control con 10% de suero.

DISCUSIÓN

El cartílago es un tejido avascular, firme y flexible especializado para absorber y resistir la compresión. Este tejido se destruye al ser sustituido por hueso durante el crecimiento, pero también en patologías como la artritis reumatoide y la osteoartritis, que son las principales causas de discapacidad severa en la población. La destrucción del cartílago durante el proceso normal de osificación y en los padecimientos artríticos mencionados, es en parte consecuencia de la acción de factores pro-apoptóticos capaces de inducir la muerte del único tipo celular del cartílago, los condrocitos. En este trabajo obtuvimos evidencias de que las vasoinhibinas se encuentran entre los factores que promueven la apoptosis de los condrocitos del cartílago articular.

Las vasoinhibinas comprenden a una familia de péptidos derivados de la hormona PRL con propiedades anti-angiogénicas y pro-inflamatorias (Corbacho *et al.*, 2002; Clapp *et al.*, 2006). La PRL está presente en el líquido sinovial y puede derivar de la PRL circulante ya que proteínas con masas moleculares menores de 100 kDa (la PRL tiene una masa molecular de 23 kDa) se difunden fácilmente entre uno y otro fluido biológico (Perman, 1980). Sin embargo, la PRL también puede generarse en los condrocitos. Los condrocitos aislados del cartílago articular expresan el RNA mensajero de la PRL y a la proteína (Macotela *et al.*, 2006), y células mesenquimales de la médula ósea expresan al RNA mensajero de la PRL cuando se les induce a diferenciarse en condrocitos (Ogueta *et al.*, 2002). Además, se ha detectado a las vasoinhibinas en medios condicionados por condrocitos y estas células secretan MMPs capaces de generarlas a partir de la PRL (Macotela *et al.*, 2006). Estos antecedentes llevaron a investigar posibles acciones locales de la PRL y de las vasoinhibinas sobre los condrocitos.

¿Por qué la apoptosis? Es bien conocido que la PRL actúa como factor de supervivencia en varios tipos celulares (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), incluidos los condrocitos (Zermeño *et al.*, 2006). Los condrocitos expresan el receptor de la PRL y la PRL inhibe la apoptosis inducida por privación de suero en estas

células (Zermeño *et al.*, 2006). Por otra parte, diversas evidencias indican que las vasoinhibinas actúan sobre receptores distintos a los receptores de la PRL (Clapp y Weiner, 1992) ejerciendo acciones contrarias o diferentes a las de la PRL (Corbacho *et al.*, 2002). Una de estas acciones es la inducción de la iNOS. Las vasoinhibinas inducen la expresión de la iNOS en forma comparable al efecto de la acción conjunta de IL-1 β , INF- γ y TNF- α , por lo que se propuso su posible acción pro-inflamatoria en las vías respiratorias (Corbacho *et al.*, 2000). Por su parte, la PRL inhibe la expresión de la iNOS inducida por dichas citocinas (Corbacho *et al.*, 2003) y por las propias vasoinhibinas (Lemini *et al.*, 2006). Esta información aunada a que el NO producto de la actividad de la iNOS se ha considerado como un importante inductor de la apoptosis de los condrocitos (Blanco *et al.*, 1995) nos llevó a investigar si las vasoinhibinas podrían actuar de manera similar a citocinas pro-inflamatorias estimulando la apoptosis de los condrocitos.

Nuestro trabajo mostró que vasoinhibinas de diferentes especies, generadas por procedimientos diferentes inducen la apoptosis de condrocitos en cultivo evaluada a través de la fragmentación del DNA y la expresión de p53. La fragmentación del DNA se evaluó mediante un ELISA que mide mono y oligonucleosomas capaces de reaccionar con anticuerpos anti-histonas y anti-DNA. Si bien es posible que este ensayo pueda medir la exposición de histonas asociadas a la reparación del DNA, la señal esperada en este caso sería muy pequeña y difícilmente explicaría la señal positiva en respuesta a vasoinhibinas que fue del 25 al 100 % sobre el valor basal. Es menester sin embargo documentar el efecto sobre la apoptosis de las vasoinhibinas con métodos complementarios como el patrón en escalera del DNA fragmentado, la evaluación de las porciones finales 3'-OH de los fragmentos de DNA producidos en respuesta a las señales apoptóticas por la técnica de TUNEL, y/o la concentración de DNA hipodiploide. Así mismo, la detección de marcadores de apoptosis como la caspasa 3. A este respecto encontramos que las vasoinhibinas aumentan p53 cuya expresión es característica de células en apoptosis (Owen-Schaub *et al.*,

1995). El uso de vasoinhibinas de diferentes orígenes y especies es importante para apoyar la especificidad de las acciones de estos péptidos. Las vasoinhibinas generadas por proteólisis enzimática a partir de una preparación referencia de PRL de rata suelen ser menos potentes (~10 veces) que las generadas a través de mutagénesis del cDNA de la PRL humana (Clapp *et al.*, 1993), pero presentan como ventaja el permitir el uso de un sistema homólogo. Por otra parte, las vasoinhibinas recombinantes poseen un grado de pureza mayor pero contienen una proporción importante de una variante glicosilada de mayor tamaño que no ha sido caracterizada (Galfione *et al.*, 2003). El hecho de que ambas vasoinhibinas estimulen la apoptosis de los condrocitos indica que el efecto observado se debe a esa proteína y no a algún posible contaminante presente en la muestra.

Las vasoinhibinas indujeron la fragmentación del DNA durante las primeras 24 h de tratamiento, pero esta alteración se tradujo en la pérdida de células solamente después de este período (siguientes 24 h). La dinámica de las diferentes fases de la apoptosis varía entre los tipos celulares (Williams y Smith, 1993) y en respuesta al tipo de factores pro-apoptóticos (Samali *et al.*, 1996). Al respecto, observamos que la privación de suero, indujo fragmentación del DNA y pérdida celular tanto a las 24 h como a las 48 h de incubación; mientras que las citocinas pro-inflamatorias, estimularon tanto la fragmentación del DNA como la pérdida celular durante a las 24 h. Estas diferencias podrían reflejar distintos mecanismos de señalización.

Así mismo, los tres inductores de apoptosis evaluados en este estudio estimulan la expresión de p53, si bien con diferente magnitud. Los aumentos de expresión fueron de 37.48, 18.43 y 4.98 (veces de inducción), para privación de suero (0.5%), vasoinhibinas y citocinas pro-inflamatorias, respectivamente. El aumento de la proteína p53 es uno de los principales mecanismos capaces de detener el ciclo celular para favorecer la reparación de DNA dañado y, por lo tanto, se asocia íntimamente con el proceso apoptótico. Ante la incapacidad de reparar el daño, p53 favorece la apoptosis a través de estimular transcripcionalmente la expresión de receptores de muerte membranales tales como CD95/Fas/APO-1 y

TRAIL receptor 2/ KILLER/ DR5 (Owen-Schaub *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1997). Además, la inducción de p53 causa una activación del factor transcripcional NF- κ B, y este efecto se correlaciona con la capacidad de p53 para inducir apoptosis (Foo y Nolan, 1999). Más aún, la inhibición o pérdida de la actividad de NF- κ B anula la apoptosis inducida por p53, indicando que NF- κ B es esencial para mediar la muerte celular por esta proteína (Ryan *et al.*, 2000). La hiperactivación de p53 ha sido asociada con una variedad de enfermedades degenerativas asociadas con el proceso apoptótico, tales como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple (Wosik *et al.*, 2003).

Por otra parte, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede conducir a la activación de p53 (Polyak *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Además, se ha mostrado en cultivos de condrocitos de conejo que un donador de NO (NPS) causa la inducción de p53 vía p38 MAP-cinasa y NF- κ B, y que la sobreexpresión de p53 incrementada por NPS induce la apoptosis de los condrocitos (Kim *et al.*, 2002). Al respecto sabemos que las vaso-inhibinas inducen la apoptosis del endotelio vascular vía la activación de NF- κ B (Tabruyn *et al.*, 2003) y que la activación de NF- κ B media la inducción de iNOS por vaso-inhibinas (Macotela *et al.*, 2002). Por lo tanto, es posible que la activación de NF- κ B por las vaso-inhibinas esté casualmente relacionada a su efecto pro-apoptótico en los condrocitos vía la inducción de la iNOS.

En apoyo a la acción pro-apoptótica del NO, corroboramos que el incremento en NO en respuesta a NPS o a las citocinas pro-inflamatorias se asocia con un aumento en la apoptosis de los condrocitos. El efecto del NPS no solo indujo apoptosis sino muy probablemente necrosis debido a los altos niveles de toxicidad alcanzados. Si bien la presencia de necrosis debe ser evaluada en futuros experimentos, es bien sabido que el NPS produce altos niveles de NO con efectos oxidantes tóxicos en distintos tipos celulares, incluidos los condrocitos (Blanco *et al.*, 1995). Por su parte, las citocinas pro-inflamatorias tuvieron efectos más controlados sobre la muerte celular que se manifestaron durante las 24 h del

tratamiento, y que podrían ser mediadas por la acción del NO promoviendo la apoptosis. Así, las citocinas estimularon la producción de NO, la apoptosis y la expresión de p53 durante las 24 h del tratamiento. De manera similar, las vaso inhibinas estimularon la fragmentación del DNA y la expresión de p53 a este tiempo, mas no la producción de NO, lo cual indica que el NO no es parte del mecanismo por el cual las vaso inhibinas estimulan la muerte programada de los condrocitos. Existen vías alternas al NO y a las ROS para activar p53 que pudieran mediar las acciones pro-apotóticas de las vaso inhibinas. Por ejemplo, se ha mostrado que la apoptosis inducida por daño al DNA puede proceder a través de la señalización de receptores de muerte (Friesen *et al.*, 1996; Kasibhatla *et al.*, 1998) y que p53 puede regular transcripcionalmente la expresión de estos receptores tales como CD95/Fas/APO-1 y el receptor TRAIL 2/KILLER/DRS (Owen-Schaub *et al.*, 1995). Aunado a que algunos de los miembros de la familia de factores pro-apotóticos, tales como Bax, Noxa o PUMA, son transcripcionalmente sitios blanco de p53.

Estudios posteriores deberán abordar la caracterización y mecanismos de los efectos de las vaso inhibinas sobre la apoptosis de los condrocitos, así como el significado funcional de estas acciones. Con respecto a este último punto es importante hacer una serie de consideraciones que si bien tienen componentes especulativos benefician la discusión del trabajo. El principal efecto de las vaso inhibinas, de donde deriva su nombre, es el de inhibir la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis. De hecho, este efecto permitió proponer que la presencia de vaso inhibinas en el cartílago refleja su participación en el control de la avascularidad de este tejido (Macotella *et al.*, 2006). No solo se detectaron vaso inhibinas en los condrocitos, sino en el medio condicionado por los mismos. Además, la adición de PRL a condrocitos en cultivo resulta en su eficiente procesamiento a vaso inhibinas por diversas MMP (MMP 3, 8, 13, 2, 9) secretadas por estas células (Macotella *et al.*, 2006). Así, la continua presencia de vaso inhibinas en el cartílago, generadas a partir de PRL proveniente tanto del líquido sinovial como de la hormona sintetizada por los propios condrocitos,

contribuiría a explicar la resistencia de este tejido a su neovascularización. ¿Cómo explicar entonces que la presencia de estos péptidos bajo condiciones normales no traiga consigo la muerte celular de los condrocitos? Desconocemos las razones de esta aparente contradicción, sin embargo podemos especular acerca de posibles explicaciones. Una de ellas se relaciona con la concentración de vasoinhibinas. En los procesos inflamatorios donde tiene lugar la muerte de los condrocitos, por ejemplo, en la artritis reumatoide y la osteoartritis, ocurre una sobreproducción de MMP que pudiera incrementar la proporción relativa de vasoinhibinas con respecto a PRL. Esta proporción es importante, si se considera que ambas proteínas tienen efectos opuestos sobre la apoptosis. Así, podría proponerse que si bien en el cartílago normal se producen suficientes vasoinhibinas para contribuir al ambiente avascular, sus efectos pro-apoptóticos estarían compensados por la presencia de la PRL que es anti-apoptótica para los condrocitos. En condiciones de enfermedad, la mayor producción de MMP favorecería la generación de más vasoinhibinas por sobre los niveles de la PRL, y por ende la manifestación de sus efectos pro-apoptóticos. El impacto del aumento de las vasoinhibinas sobre la neovascularización del cartílago que también caracteriza a los procesos inflamatorios de la articulación podría ser contrarrestado por la presencia de abundantes factores angiogénicos que se sabe resultan de la infiltración de células inmunocompetentes y de la zona de interfase con el tejido óseo, entre otras fuentes (Pap y Distker, 2005).

Estas ideas deberán valorarse en futuros estudios *in vivo* o *in vitro* a través de evaluar las concentraciones relativas de PRL y de vasoinhibinas en los condrocitos expuestos a las citocinas pro-inflamatorias o bien en condrocitos provenientes de cartílagos artríticos, así como la determinación de las actividades de las MMP que se sabe generan a dichos péptidos bajo las mismas condiciones pro-inflamatorias.

En conclusión, en este trabajo mostramos evidencias de que las vasoinhibinas ejercen acciones pro-apoptóticas sobre los condrocitos del cartílago

articular que no parecen ser mediadas por la producción de NO. Si bien, documentamos acciones pro-apotóticas de las citocinas pro-inflamatorias que pueden involucrar al NO, nuestro trabajo indica que el NO no es un mediador suficiente para que tenga lugar la muerte de los condrocitos.

BIBLIOGRAFÍA

Adams JM y Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**:61-6.

Alfaro E, García, C y Dueñas A. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología* **46**:275-80.

Amin AR y Abramsom SB. 1998. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **10**:263-8.

Amin AR, Attur MG, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ y Rediske J. 1997. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis affected cartilage: influence of nitric oxide. *J Clin Invest* **99**:1231-7.

Anthony PK y Powers CA. 1993. Characterization of cysteamine induction of the 22K prolactin variant in the rat pituitary. *Neuroendocrinology* **57**:167-76.

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo 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* **46**:2947-53.

Ashkenazi A y Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-8.

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**: 935-38.

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.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL y Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* **17**: 639-69.

Bennett M, MacDonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R y Weissberg P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**: 290-93.

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**:171-88.

Blanco FJ y Fernandez-Sueiro LJ. 1998. Artrosis: concepto, clasificación, epidemiología, y patogenia. En: Pascual E, Rodríguez Valverde V, Carbonell J, Gomez-Reino J, editores. Reumatología: Enfermedades del aparato locomotor, vol 1. Madrid: editorial Aran, 1609-42.

Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, De Toro FJ y Galdo F. 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis Rheum* **41**:284-9.

Blanco FJ, Ochs RL, Schwartz H y Lotz M. 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* **146**:75-85.

Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G y Guicheux J. 2007. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* **40**:568-76.

Bolanos J, Heales S, Land J y Clark J. 1995. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem* **64**:1965-72.

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**:225-68.

Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-59.

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**:1380-6.

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**:301-07.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F y Weiner RI. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**:1292-99.

Clapp C, Sears PS y Nicoll CS. 1989. Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* **125**:1054-59.

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 USA* **91**:10384-88.

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**:2055-64.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblast. *FEBS Lett* **544**:171-5.

Corbacho AM, Martinez 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**:219-38.

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**:13183-86.

Dawson TM y Dawson VL.1994. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* **99**:9-90.

Dawson VL y Dawson TM. 1996. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* **3**:71-8.

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**: 393-7.

Farrel AJ, Blake DR, Palmer RM y Moncada S. 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **51**:1219-22.

Foo SY y Nolan GP. 1999. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* **15**:229-35.

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**:1107-17.

Friesen C, Herr I, Krammer PH y Debatin KM. 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* **2**:574-77

Galfione M, Luo W, Kim J, Hawke D, Kobayashi R, Clapp C, Yu-Lee LY y Lin SH. 2003. Expression and purification of angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif* **28**:252-58.

Geller DA, y Billiar. 1998. Molecular biology of nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev* **7**:7-23.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z y Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5**:623-28.

Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW y McManus BM. 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* **78**:893-913.

Gross A, McDonnell JM y Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**:1899-911.

Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S y Lotz M. 1998. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**:1632-8.

Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y y Jasin H. 1997. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **40**:261-9.

Hetts SW. 1998. To die or not die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279**:300-7.

Hoffmann T, Penel C y Ronin C. 1993. Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *J Endocrinol Invest* **16**:807-16.

Hopf HW, Gibson JJ, Angeles AP, Constant JS, FENA JJ, Rollins MD, Zamirul-Hussain M y Hunt TK. 2005. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen* **13**:558-64.

Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E y Landis WJ. 2006. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* **12**:691-703.

Ito Y, Fitzsimmos JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N y O'Driscoll SW. 2001. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* **9**:215-23.

Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J y Terkeltaub R. 2000. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum* **43**:1560-70.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A y Green DR. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappaB and AP-1. *Mol Cell* **1**:543-51.

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 Cell Biochem* **277**:1332–9.

Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* **11**:101-5.

Kroemer G, Zamzami N. y Susin SA. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. **18**:44-51.

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**:3696-703.

Lemini M, Gonzalez C, Garcia C, Nava G, Lopez-Barrera F, Martinez de la Escalera G, y Clapp C. 2006. Acciones opuestas de la prolactina y de las vaso-inhibinas sobre la actividad de la sintetasa endotelial de oxido nitrico y la proliferacion de celulas endoteliales coronarias. Jornadas Conmemorativas, 13° Aniversario, Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

Li H y Yuan J. 1999. Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **11**:261-6.

Li PF, Dietz R y Von Harsdorf R. 1999. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J EMBO*. **18**:6027-36

Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaipf U y Kalden RJ. 2000. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* **5**:443-49.

Lotz M. 1999. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* **25**:269-82.

Lowe SW y Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**:485-95.

Macotella Y, Aguilar M, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, Lopez Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate antiangiogenic 16K-prolactin. *J Cell Sci* **119**:1790-800.

Macotella Y, Mendoza C, Corbacho AM, Cosio G, Eiserich JP, Zentella A, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 2002. 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J Endocrinol* **175**:R13-18.

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**:1536-49.

Mateo L, Nolla JM, Bonnin MR, Navarro MA, Roig-Escofet D. 1998. High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **25**:2077-82.

Merkle CJ, Schuler LA, Schaeffer RC Jr, Gribbon JM y Montgomery DW. 2000. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cell: evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine* **13**:37-46.

Mistry D, Oue Y, Chambers MG, Kayser MV y Mason RM. 2004. Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **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.

Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann W, Stremmel W, Krammer PH y Galle PR. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is

mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest* **99**:403-13.

Murrell GAC, Jang D y Williams RJ. 1995. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **206**:15-21.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS y Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activación. *J Biol Chem* **273**:2926-30.

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.

Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E y Garcia-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.

Owen-Schaub LB, Zhang W, Usack JM, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang W, Kruzel E y Radinsky R. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce fas/apo-1 expression. *Mol Cell Biol* **15**:3032-40.

Pap T y Distler O. 2005. Linking angiogenesis to bone destrucción in arthritis. *Arthritis Rheum* **52**:1346-48.

Parkinson JF, Mitrovic B y Merrill JE. 1997. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* **75**:174-186.

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. *Osteoarthritis Cartilage* **4**:77-84.

Perman V. 1980. Synovial fluid. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, edn 3. Ed J Kaneko. New York, NY, USA: Academic Press Inc.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW y Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**:300-5.

Reed JC. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**:773-6.

Reidske JJ, Koehne FC, Zhang B y Lotz M. 1994. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage* **2**:199-206.

Ricken AM, Traenkner A, Merkwitz C, Hummitzsch K, Grosche J y Spanel-Borowsky K. 2007. The short prolactin receptor predominates in endothelial cell of micro and macrovascular origin. *J Vasc Res* **44**:19-30.

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR y Vousden KH. 2000. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* **404**:892-97.

Samali A, Gorman AM y Cotter TG. 1996. Apoptosis the story so far. *Experientia* **52**:933-41.

Seriolo B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D y Cutolo M. 2002. Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* **966**:258-62.

Sinha YN. 1995. Structure variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* **16**:354-69.

Slee EA, Adrain C y Martin SJ. 1999. Serial Killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**:1067-74.

Stefanovic-Racic M, Morales TI, Taskiran D, McIntyre LA y Evans CH. 1996. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J Immunol* **156**:1213-20.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI y Martial JA. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1246-51.

Studer RK, Georgescu HI, Miller LA y Evans CH. 1999a. Inhibition of transforming growth factor β production by nitric oxide-treated chondrocytes: implications for matrix synthesis. *Arthritis Rheum* **42**:248-57.

Studer RK, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD y Evans CH. 1999. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**:377-9.

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Tours 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**:1815-23.

Tamura T, Nakanishi T, Kimura Y, Hattori T, Sasaki K, Norimatsu H, Takahashi K y Takigawa M. 1996. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced matrix degradation and basic fibroblast growth factor release in cultured rabbit articular chondrocytes: a possible mechanism of pathological neovascularization in arthritis. *Endocrinology* **137**:3729-37.

Taskiran D, Stefanoic-Racic M, Georgescu HI y Evans CH. 1994. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:142-8.

Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-62.

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**:5454-60.

Tzeng SJ y Linzer DI. 1997. Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Mol Reprod Dev* **48**:45-52.

Ueda E, Ozerdem U, Chen YH, Yao M, Huang KT, Sun H, Martins-Green M, Bartolini P y Walter AM. 2006. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocr Relat Cancer* **13**:1-18.

Valesini G, Barone F, Bompane D, Catuogno M y Scavalli AS. 2004. Advances in immunology and rheumatoid arthritis pathogenesis. *Reumatismo* **56**:9-20.

Wang YF y Walker AM. 1993. Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology* **133**:2156-60.

Williams GT y Smith CA. 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* **74**:777-9.

Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Bruck W, Massie B y Nalbantoglu J. 2003. Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J Neurochem* **85**:635–644.

Wu GS, Burns TF, McDonald III ER, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G y El-Deiry WS. 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* **17**:141-43.

Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E y Olsen BR. 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* **131**:2161-71.

Zermeño C, Guzman-Morales J, Macotella Y, Nava G, Lopez-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, Martinez de la Escalera G y Clapp C. 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* **189**:R1-8.