



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA Y LAS VASOINHIBINAS EN LA
SUPERVIVENCIA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. C. MARÍA NORMA ADÁN CASTRO

TUTOR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE, 2014



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 bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez L., en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro. Fue financiada por la UNAM, programa PAPIIT-IN200312, y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro de becario 223363.

Agradezco infinitamente:

- La dirección académica del comité tutor integrado por la Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez L., la Dra. Maricela Luna Muñoz y la Dra. Janette Furuzawa Carballeda.
- El apoyo técnico del Nutr. Fernando López Barrera.
- La asistencia de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.
- El apoyo de la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos responsable de la Unidad de Microscopía, y al MVZ. Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla responsables del bioterio, del Instituto de Neurobiología.
- La asistencia académica de la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefe de la unidad de enseñanza de Estudios de posgrado en el Instituto de Neurobiología.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	-i
RESUMEN	-ii
ABSTRACT	-iv
I. INTRODUCCIÓN	-1
II. ANTECEDENTES	-3
II.1 La articulación sinovial y el cartílago articular	-3
II.1.1 Los condrocitos y la matriz extracelular	-4
II.2 El sinovio y el líquido sinovial	-7
II.3 La artritis inflamatoria	-9
II.3.1 La artritis reumatoide	-10
II.3.2 La osteoartritis	-11
II.3.3 Destrucción inflamatoria de la articulación	-12
II.3.4 La apoptosis de los condrocitos	-15
II.4 La prolactina	-16
II.5 Las vasoinhibinas	-19
II.6 Efecto de la PRL sobre el cartílago articular y la posible implicación de las Vi	-21
III. JUSTIFICACIÓN	-24
III.1 Primera (sobre la evaluación de los efectos de la PRL)	-24
III.2 Segunda (sobre la evaluación de los efectos de las Vi)	-24
IV. HIPÓTESIS	-25
V. OBJETIVOS	-26
V.1. Objetivos generales	-26
V.2. Objetivos particulares	-26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	-28
VI.1. Materiales	-28
VI.1.1. Reactivos	-28
VI.1.2. Animales	-28
VI.2. Métodos	-29
VI.2.1. Aislamiento y cultivo de condrocitos	-29
VI.2.2. Evaluación de apoptosis mediante ELISA	-29
VI.2.3. Western blot de proteínas en lisados celulares	-30

VI.2.4.	Valoración de nitritos y nitratos mediante en ensayo de Griess -----	-31
VI.2.5.	Inmunocitoquímica para la detección de STAT3-----	-31
VI.2.6.	Desarrollo de Artritis inducida por adyuvante (AIA) -----	-32
VI.2.7.	Evaluación de apoptosis <i>in situ</i> mediante TUNEL -----	-33
VI.2.8.	Inmunohistoquímica para la detección de la caspasa-3 activa -----	-33
VI.2.9.	qRT-PCR -----	-34
VI.3.0.	Ensayo del corte de PRL exógena por condrocito en cultivo -----	-35
VI.3.1.	Inyección intra-articular de Cit en la rodilla del ratón <i>rprl</i> ^{-/-} -----	-35
VI.3.2.	Inmunoprecipitación y Western blot de PRL y Vi séricas -----	-35
VI.3.3.	Análisis estadístico -----	-36
VI.3.4.	Aprobación ética del estudio -----	-36
VII.	RESULTADOS -----	-37
VII.1	La PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit -----	-37
VII.2	El efecto condroprotector de la PRL en contra de la apoptosis inducida por Cit no involucra la inhibición del NO -----	-40
VII.3	El efecto condroprotector de la PRL en contra de la apoptosis inducida por Cit involucra la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3 -----	-41
VII.4	Desarrollo de la artritis inducida por adyuvante (AIA) en la rata -----	-43
VII.5	La hiperprolactinemia previene la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA -----	-44
VII.6	La hiperprolactinemia mitigan la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA establecida -----	-48
VII.7	El tratamiento con Cit favorece la proteólisis de PRL por condrocitos en cultivo -----	-50
VII.8	La inyección intra-articular de Cit favorece la proteólisis de PRL hacia Vi en el ratón <i>rprl</i> ^{-/-} -----	-51
VII.9	Las Vi inducen la apoptosis de los condrocitos -----	-52
VII.10	El efecto proapoptótico de las Vi sobre los condrocitos no involucra la inducción de la vía iNOS/NO -----	-54
VIII.	DISCUSIÓN -----	-55
IX.	CONCLUSIONES -----	-61
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	-62
XI.	ÍNDICE DE FIGURAS -----	-74
XII.	ÍNDICE DE TABLAS -----	-75
XIII.	ANEXOS -----	-76

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artritis reumatoide
OA	Osteoartritis
PRL	Prolactina
RPRL	Receptor de prolactina
<i>prlr</i>^{+/+}	Ratón silvestre
<i>prlr</i>^{-/-}	Ratón carente del receptor de prolactina
Vi	Vasoinhibinas
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
IFN-γ	Interferón- γ
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-17	Interleucina-17
Cit	Mezcla de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ
LIF	Factor inhibidor de leucemia
NO	Óxido nítrico
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
L-NAME	N(G)-nitro-L-arginina metil éster
casp-3	Caspasa-3
procasp-3	Procaspasa-3
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
MMPs	Metaloproteasas de matriz
AIA	Artritis inducida por adyuvante
ACF	Adyuvante completo de Freund
JAK2	Janus cinasa 2
STATs	Transductores de señal y reguladores de la transcripción
STAT3	Transductor de señal y regulador de la transcripción 3
PGs	Proteoglicanos
PGE₂	Prostaglandina E ₂
BMP-1	Proteína morfogénica de hueso tipo 1
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
SRC	Cinasa de tirocina relacionada con la oncoproteína del virus de sarcoma de Rous
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
AKT	Cinasa de serina/treonina
GAS	Secuencia de activación de interferón
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MIP-1a	Proteína inflamatoria de macrófagos
MIG	Monocina inducida por IFN- γ
TLRs	Receptores parecidos a Toll
VCAM	Molécula de adhesión vascular 1
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
CD44	Glicoproteína de superficie celular asociada con las interacciones célula-célula
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico

RESUMEN

El cartílago está constituido por una única población de células denominadas condrocitos, que producen y secretan a la matriz extracelular que las embebe y que determina las propiedades biomecánicas del cartílago. La apoptosis condrocitaria característica de las artropatías inflamatorias como la artritis reumatoide (AR), obedece a la acción de citocinas como la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y el interferón- γ (IFN- γ), y su inhibición representa una alternativa terapéutica potencial contra dichos padecimientos. En la circulación y el líquido sinovial de pacientes con AR se incrementan frecuentemente los niveles de la hormona prolactina (PRL), que actúa como un factor antiapoptótico sobre diversos tipos celulares. En este trabajo demostramos que la PRL inhibe la muerte condrocitaria inducida por inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*. La PRL protege a los condrocitos en cultivo contra la apoptosis inducida por una combinación de IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ (Cit), y sus efectos son dosis-dependiente e involucran la inhibición de la fragmentación del ADN y la activación de la caspasa-3, así como la prevención del incremento de la expresión de la p53 y del cociente Bax/Bcl2 dependiente de Cit. Las señales mediadoras de la acción condroprotectora de la PRL incluyen a la activación de la vía JAK2/STAT3, que es la vía de señalización clásica de esta hormona, pero no involucran a la inhibición de la vía del óxido nítrico inducida por Cit. Asimismo, demostramos que el incremento en los niveles circulantes de la PRL con minibombas osmóticas de infusión o el tratamiento farmacológico con Haloperidol, contrarresta la muerte de los condrocitos articulares de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). Estos resultados evidencian acciones condroprotectoras de la PRL bajo condiciones de inflamación, y la señalan como un factor capaz de favorecer la preservación del cartílago en las artropatías inflamatorias. Por otro lado, dado que la inflamación propicia la activación de proteasas mediadoras del corte proteolítico de la PRL hacia vasoinhibinas (Vi), una familia de péptidos derivados de la hormona y con efecto proapoptótico sobre el cartílago, se evaluó la generación de Vi inducida por Cit tanto *in vitro* como *in vivo*. Las Cit favorecieron el corte de la PRL hacia Vi en condrocitos en cultivo, y la inyección intra-articular de Cit en el ratón carente del receptor para la PRL (*rprl*^{-/-}) indujo la generación de Vi detectables en el suero, sugiriendo que la inflamación induce la muerte condrocitaria no solo a través de activar mecanismos de apoptosis y degradación de la matriz, sino también a través de eliminar factores de supervivencia natural para los condrocitos. No obstante, dado que la hiperprolactinemia contrarrestó la apoptosis condrocitaria

inducida por la AIA, proponemos que la resultante final de los efectos de la PRL/Vi sobre el cartílago depende de la concentración de la PRL, de la relación PRL/Vi determinada por la presencia de proteasas en el microambiente celular, y de la competencia recíproca entre sus acciones.

ABSTRACT

Chondrocytes, the only cell type in cartilage, produce and secrete the extracellular matrix that determines the biomechanical properties of the tissue. Chondrocyte apoptosis is a hallmark of inflammatory arthritis, including rheumatoid arthritis (RA), and occurs as a consequence of the action of proinflammatory cytokines such as: interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ). The inhibition of cytokines-dependent chondrocyte apoptosis is a potential tool for the treatment of inflammatory arthropathies. The hormone prolactin (PRL) frequently increases in the circulation and synovial fluid of patients with RA, and PRL is an antiapoptotic factor for various cell types. In this work we demonstrate that PRL inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by inflammatory conditions both *in vitro* and *in vivo*. PRL protected chondrocytes in culture against the apoptosis induced by a combination of IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ (Cit); and this effect was dose-dependent and involved the inhibition of DNA fragmentation and caspase-3 activation, as well as the prevention of the increment in the p53 expression and Bax/Bcl-2 ratio. The signals mediating the actions of PRL involved the activation of the JAK2/STAT3 pathway, which is the classical signaling pathway of PRL, but not the inhibition of nitric oxide induced by Cit. We also show that increasing circulating levels of PRL with either miniosmotic infusion pumps or by the pharmacological treatment with Haloperidol, counteracts the apoptosis of articular chondrocytes in the adjuvant induced-arthritis (AIA) model in rats. These results show the chondroprotective action of PRL under inflammation, and its capacity to preserve cartilage in the inflammatory arthropathies. In the other hand, inflammatory conditions promote the activation of proteases able to cleavage PRL to vaso-inhibins (Vi), a family of PRL fragments with proapoptotic effect on cartilage. Here we show that Cit treatment increases the cleavage of PRL to Vi in cultured chondrocytes, and that the intra-articular injection of Cit in hyperprolactinemic mice lacking the receptor for PRL (*rprl*^{-/-}), associates with higher levels of Vi in serum. These findings suggest that Cit induce cartilage destruction by eliciting chondrocyte apoptosis directly, but also by converting the survival factor PRL to proapoptotic vaso-inhibins. However, since hyperprolactinemia inhibited chondrocyte apoptosis induced by AIA, we propose that the outcome of PRL effect on cartilage survival depends on PRL concentration, the ratio of PRL to Vi levels, determined by the activity of PRL cleaving proteases in the tissue microenvironment, and the mutual competition between their opposing effects on chondrocyte apoptosis.

II. ANTECEDENTES

II.1. La articulación sinovial y el cartílago articular

La articulación sinovial es el tipo de articulación con mayor movimiento en los mamíferos pero también la más afectada por su uso y la presencia de artropatías inflamatorias (Gorman and Cope, 2008). Su estructura consiste en el punto de acercamiento de dos huesos e incluye tejidos que le brindan protección y soporte, i.e.; cartílago articular, sinovio, meniscos, además de músculos, tendones, ligamentos, y bursas (Firestein, 2008) (**Fig. 1**). Los movimientos articulares ocurren sin daño estructural gracias a que el cartílago recubre la superficie de los huesos en cercanía (**Fig. 1**) y mitiga la fricción del movimiento tras distribuirla y disiparla sobre el hueso subcondral [hueso subyacente]. La localización anatómica y propiedades mecánicas del cartílago articular lo hacen blanco del desgaste y de los cuadros inflamatorios dentro de la articulación.

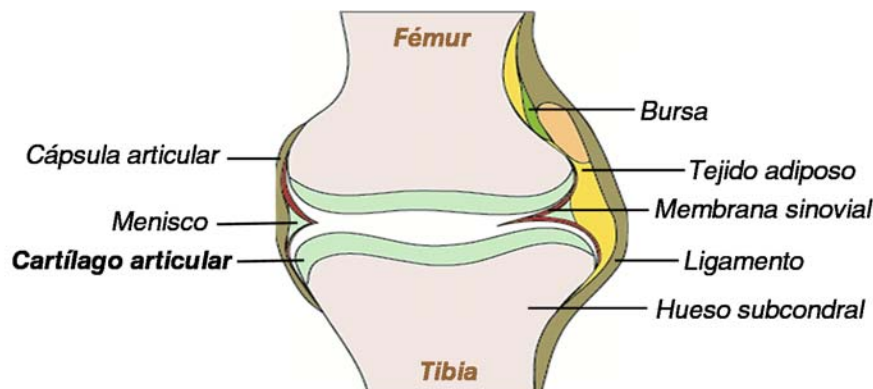


Figura 1. Articulación sinovial de rodilla.

Bajo condiciones normales el cartílago articular carece de nervios y es avascular; no posee vasos sanguíneos ni linfáticos, y su nutrición depende de moléculas provenientes del líquido sinovial principalmente, y de la vasculatura ósea subcondral (Firestein, 2008; Salter, 1998). Histológicamente se describe como un tejido hipocelular que posee una escasa y única población de células llamadas condrocitos que producen y secretan a los componentes de la matriz extracelular que los embebe. Más aún, el hecho de que estas células pierdan fisiológicamente la capacidad de dividirse convierte al cartílago en un tejido postmitótico, un fenómeno que en el humano ocurre a partir de la adolescencia. Por su parte la matriz que soporta a los condrocitos continúa renovándose a lo largo de la vida

del individuo, proceso que depende de la supervivencia de los condrocitos y de sus respuestas homeostáticas.

II.1.1. Los condrocitos y la matriz extracelular

Los condrocitos constituyen el único tipo celular en el cartílago y su población ocupa, dependiendo de la especie, entre el 1 y el 5% del volumen total del tejido (Buckwalter and Mankin, 1998; Goldring, 2006; Kuettner, 1992). En el humano adulto por ejemplo, el cartílago tiene un grosor de aproximadamente 5 mm y la matriz que embebe a los condrocitos constituye aproximadamente el 99% de su volumen (Buckwalter and Mankin, 1998; Kuettner, 1992). A pesar de su escaso número, los condrocitos mantienen en equilibrio la tasa de producción y recambio de los componentes de la matriz, a través de la cual difunden pasivamente nutrientes, factores de crecimiento, y citocinas que determinan su metabolismo (Berenbaum, 2000; Buckwalter and Mankin, 1998; Salter, 1998). Entre los componentes de matriz se incluyen colágenas (\approx 60%), proteoglicanos (PGs; 25-35%), y proteínas distintas a las colágenas (15-20%) (Buckwalter and Mankin, 1998). Entre las colágenas se encuentran las de tipo VI, IX, X, XI, mientras que la tipo II es la más abundante (90-95% de las colágenas) y específica del cartílago articular (Martel-Pelletier et al., 2008). Los PGs en dicho tejido incluyen moléculas pequeñas como la decorina, el biglicano y la fibromodulina, moléculas grandes no agregadas y moléculas como el queratán sulfato y el sulfato de condroitina que se ensamblan sobre un esqueleto proteico para formar grandes agregados llamados agreganos. Los agreganos constituyen el 90% de los PGs y se ensamblan a su vez sobre largos filamentos de ácido hialurónico formando estructuras más complejas (Jeffrey and Watt, 2003). Los PGs están implicados en la retención de agua en el cartílago (Buckwalter and Mankin, 1998), y son estructuras mecánicamente sensibles reforzadas por las fibras de colágena altamente resistentes a la tensión (Heinegard and Oldberg, 1989). Los PGs, las colágenas, y el resto de los componentes de la matriz forman un entramado molecular altamente organizado desde la superficie hasta la parte más profunda del tejido.

En razón de la organización molecular de la matriz del cartílago se han descrito cuatro zonas histológicas: 1) la zona superficial o tangencial, 2) la zona media o de transición, 3) la zona profunda o radial y 4) el cartílago calcificado (Buckwalter and Mankin, 1998;

Martel-Pelletier et al., 2008; McCauley and Disler) (**Fig. 2A**). Dichas zonas difieren entre sí por la constitución y orientación de sus moléculas, pero también por la morfología, tamaño y actividad metabólica de sus condrocitos (Buckwalter and Mankin, 1998) (**Fig. 2A-C**). La zona superficial se encuentra en contacto con el líquido sinovial y es el sitio donde reside la mayor fuerza de tensión en el tejido (Martel-Pelletier et al., 2008), está conformada por finas fibras de colágena [entremezclada con un bajo contenido de PGs] que se orientan paralelamente a la superficie del cartílago (Disler et al., 2000; McCauley and Disler, 1998), los condrocitos en esta zona poseen cuerpos elongados con la misma orientación que las fibras de colágena, y producen y secretan moléculas para la lubricación del cartílago, i.e.; la lubricina, llamada alternativamente proteína de zona superficial (SZP), y que además es útil para la identificación fenotípica de dichos condrocitos (Pearle et al., 2005; Schumacher et al., 1999). La zona media posee una matriz rica en PGs y gruesas fibras de colágena con orientación oblicua que rodean células con forma esférica (McCauley and Disler, 1998). En la zona profunda los condrocitos también son esféricos pero se alinean en columnas perpendiculares a la superficie y la matriz que los rodea contiene la mayor cantidad de agreganos con fibras de colágena que son más largas que en el resto de las zonas. Dichas fibras se extienden hasta el cartílago calcificado anclando el cartílago articular al hueso subcondral (Salter, 1998). El cartílago calcificado sirve de interfase entre cartílago y hueso subcondral, y es atravesado por una marca histológica llamada línea de marea (Disler et al., 2000) (**Fig. 2A-C**).

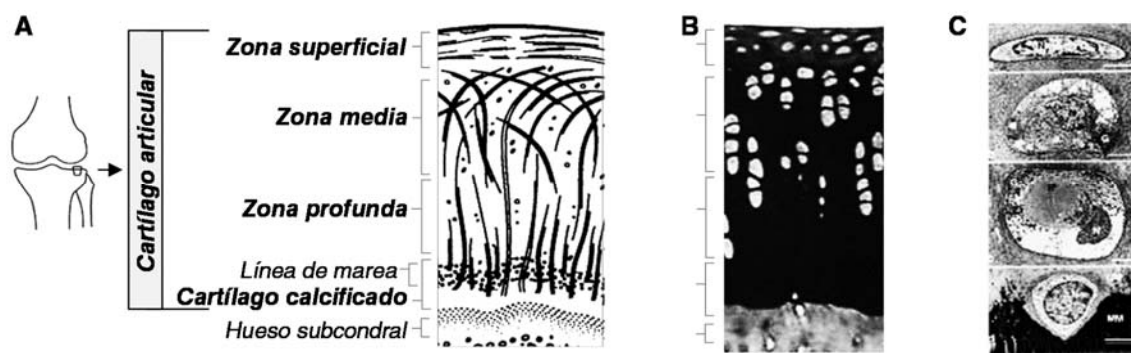


Figura 2. Estructura molecular y celular del cartílago articular. (A) Esquema ilustrativo del arreglo zonal de las fibras de colágena. (B) Fotomicrografía de una sección sagital de cartílago que muestra la distribución, el arreglo, y la forma de los condrocitos en el tejido. (C) Fotomicrografías que ilustran la morfología del condrocito de acuerdo a la zona en la cual reside.

A: con modificaciones (McCauley and Disler, 1998); **B – C:** con modificaciones (Buckwalter and Mankin, 1998).

La estructura e integridad del cartílago obedece a la tasa de recambio de los componentes de su matriz (síntesis y degradación), una función de la respuesta condrocitaria a señales físicas, mecánicas, y químicas. Las señales físicas incluyen cambios en la dinámica del flujo de fluidos y los gradientes de presión hidrostática (Kuettnner, 1992), ocasionados a su vez por estímulos mecánicos que deforman al cartílago. La deformación de la matriz en el tejido modifica el flujo de cationes como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e H^+ regido por un sistema de transporte activo en la membrana de los condrocitos (Wilkins et al., 2000), esta modificación es un indicador de cambio en el medio circundante. Los estímulos deformantes activan también sistemas de mecanorrecepción constituidos por filamentos intracitoplásmicos, cilios cortos que van de la célula a su matriz (Buckwalter and Mankin, 1998), elementos de membrana como la ancorina CII (Kuettnner, 1992) y las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ (Holmvalld et al., 1995) que reconocen con gran afinidad a las fibras de colágena tipo II, y los receptores tipo CD44 (glicoproteínas de superficie celular asociada con las interacciones célula-célula) que reconocen al ácido hialurónico (Knudson and Loeser, 2002; Salter, 1998). La transducción del estímulo a través de estos sistemas de mecanorrecepción induce la producción de agreganos y colágena tipo II en condrocitos aislados, en los cuales, al ser sembrados además en presencia de una matriz constituida por dicha colágena, se induce la expresión de la subunidad $\alpha 2$ de las integrinas (Holmvalld et al., 1995), indicando que los estímulos mecánicos influyen la composición de la matriz, y que esta a su vez constituye una señal que dirige la expresión de los sistemas de mecanorrecepción.

Por otra parte, entre los mensajeros químicos que estimulan el recambio de la matriz del condrocito se incluyen hormonas, factores de crecimiento, y citocinas provenientes de la circulación o del medio local. Los factores químicos locales pueden derivar de los [mismos] condrocitos en el cartílago, de sinoviocitos y endotelio vascular en el sinovio, así como de osteoblastos y osteoclastos del hueso subcondral (Goldring, 2006; Salter, 1998). La concentración de los mensajeros químicos es un factor determinante en sus efectos catabólicos [de degradación] o anabólicos [de síntesis] sobre el cartílago. Entre las moléculas con efectos catabólicos se incluye a la $\text{IL-1}\beta$ y al $\text{TNF-}\alpha$, y entre los mediadores

anabólicos se cuentan al factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-1), al factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y al factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Salter, 1998; Westacott and Sharif, 1996). Dichas moléculas acceden al condrocito tras difundir pasivamente en el entramado molecular de su matriz, o bien, se almacenan y liberan al momento de la degradación de la misma (Berenbaum, 2000), esto último constituye un mecanismo que asegura la presencia continua de una amplia gama de factores humorales en el entorno cercano a los condrocitos.

La incapacidad de los condrocitos para responder a los estímulos anabólicos y la inducción de su muerte por apoptosis, favorecen la destrucción acelerada del cartílago articular en la artritis inflamatoria, donde alteraciones patofisiológicas sobre tejidos como el sinovio están implicadas en el desarrollo y/o mantenimiento de la inflamación articular.

II.2. El sinovio y el líquido sinovial

El sinovio es un tejido fundamental en la fisiología y el metabolismo articular. Sus acciones incluyen la protección inmunológica y la fagocitosis dentro de la articulación, además de la nutrición y lubricación del cartílago (Pavlovich and Lubowitz, 2008). En este contexto, la fagocitosis permite la eliminación de bacterias y fragmentos pequeños que se desprenden del cartílago como resultado del uso articular, de la artritis, o los traumas (Pavlovich and Lubowitz, 2008), evitando que se acumulen en el espacio intra-articular (Berumen-Nafarrate et al., 2002). A su vez, el sinovio produce el denominado líquido sinovial a través del cual se transporta a los nutrientes hacia los condrocitos, se recogen los desechos metabólicos del cartílago, y se aportan componentes para la lubricación de dicho tejido. La lubricación de la superficie del cartílago disminuye el coeficiente de fricción y reduce su desgaste. La falla en dicho proceso está implicada en la patogénesis de algunas artropatías degenerativas (Jay et al., 2004).

Histológicamente, el sinovio se conforma por la membrana subíntima y la íntima o membrana sinovial. La membrana subíntima se localiza entre la cápsula articular y la membrana sinovial, alberga vasos mayores y capilares sanguíneos, y se conforma principalmente por macrófagos, fibroblastos y células adiposas (**Fig. 3**). La membrana sinovial es la cara expuesta del sinovio, contacta con el líquido sinovial en la cavidad intra-

articular y está constituida por sinoviocitos tipo A (células parecidas a macrófagos) y tipo B (células parecidas a fibroblastos).

En condiciones normales la membrana sinovial tiene un grosor de no más de tres células (**Fig. 3**) de las cuales entre el 80 y el 85% corresponden a sinoviocitos tipo B (Firestein, 2008), encargados de producir al líquido sinovial y liberar en éste moléculas de matriz o de lubricación para el cartílago, i.e.; colágenas, fibronectina, ácido hialurónico (Iwanaga et al., 2000; Muller-Ladner et al., 2007), fosfolípidos activos de superficie (SALP), y lubricina (Iwanaga et al., 2000; Schmidt et al., 2007). Los sinoviocitos tipo A actúan como células presentadoras de antígeno (Iwanaga et al., 2000) y llevan a cabo eficientemente la fagocitosis (Kamimoto et al., 2003), teniendo para esta última un sistema vesicular y lisosomal altamente desarrollado que les permite remover elementos de matriz, detritos celulares y microorganismos (Iwanaga et al., 2000).

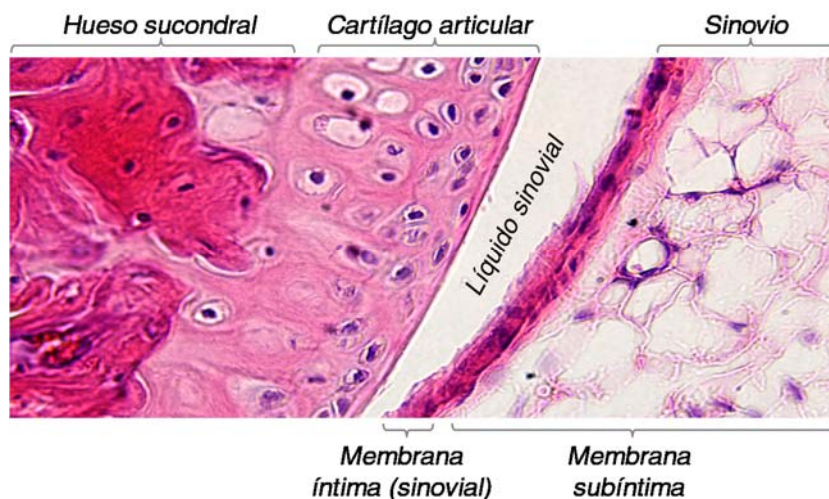


Figura 3. Fotomicrografía de una sección sagital de rodilla de rata teñida con hematoxilina y eosina. Sobre la imagen se indica el hueso subcondral, el cartílago articular y el sinovio, señalando en este último a la membrana sinovial (íntima) y subíntima.

En condiciones patológicas (i.e.; artritis inflamatoria) la membrana sinovial se hace hiperplásica, se infiltra por células inmunocompetentes provenientes de la circulación (i.e.; linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, y macrófagos (Gorman and Cope, 2008)), se hipervasculariza y se extiende formando un frente inflamatorio denominado *pannus* (Dayer, 2003; Gorman and Cope, 2008) que se adhiere y expande a partir de la

intersección hueso – cartílago, erosionando a ambos tejidos (**Fig. 4**). Más aún, las células infiltradas en conjunto con las residentes redundan en la secreción de citocinas, enzimas proteolíticas (i.e.; metaloproteasas de matriz (MMPs) y catepsinas) y factores proangiogénicos que promueven la destrucción articular.

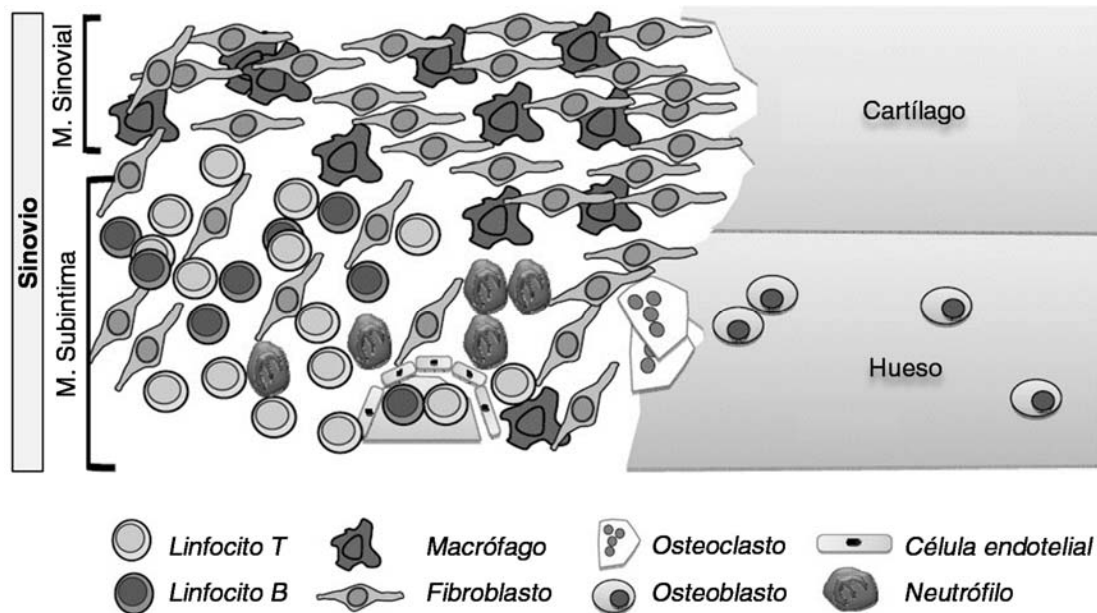


Figura 4. Sinovio en condiciones inflamatorias. Células de la membrana sinovial (M. Sinovial) y membrana subíntima (M. Subíntima) invadiendo la intersección hueso – cartílago. Extraída y modificada de Juárez y col., 2012 (Juarez et al., 2012).

II.3. La artritis inflamatoria

El término artritis inflamatoria define a un conjunto de padecimientos (artropatías) que tienen como blanco principal a las articulaciones y cuyo deterioro ocurre mediante la participación activa del sistema inmunitario (Adan et al., 2014).

La primera línea de defensa del organismo es puesta en marcha por la activación de los receptores parecidos a Toll (TLRs), una familia de receptores de reconocimiento de patrones (RPPs) afines a ligandos con estructuras moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs). La activación de los TLRs es fundamental para la activación del sistema inmunitario innato y es prerequisite para la activación del sistema inmunitario adaptativo. Los ligandos activadores de TLRs incluyen derivados virales y bacterianos

pero también ligandos endógenos derivados de tejidos y células del hospedero (Berenbaum, 2013; Yu et al., 2010). Los ligandos endógenos incluyen proteínas de choque térmico como la gp96 (Huang et al., 2012), ácidos nucleicos (Barbalat et al., 2011) y derivados de matriz extracelular como fibronectina, heparan sulfato, biglicano, fibrinógeno, y fragmentos de la degradación del ácido hialurónico (Yu et al., 2010). El hecho de que los ligandos endógenos derivados de matriz que arriba se refieren constituyan componentes básicos de la matriz extracelular del cartílago, los convierte en fuertes candidatos para la activación del sistema inmunitario dentro de las articulaciones y a este respecto se ha reportado la presencia de fragmentos de fibronectina y ácido hialurónico en el líquido sinovial (Kim et al., 2006). Es posible que la activación repetida de TLRs por componentes derivados del uso o desgaste articular cotidiano, acompañado de la sensibilidad patológica de las células inmunitarias favorezca la pérdida de tolerancia y, por ende, la autoinmunidad generadora de artritis. De hecho, es posible que el incremento del sistema ligando – TLR aumente la frecuencia de activación de vías de señalización conocidas para inducir la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, y proteasas, capaces de estimular la hiperplasia sinovial (desarrollo de *pannus*), la quimioatracción de las células inmunocompetentes, y el desencadenamiento de la destrucción del hueso y del cartílago. Estas alteraciones han sido evaluadas minuciosamente en al menos las dos formas de artritis inflamatoria más comunes a nivel mundial, la artritis reumatoide y la osteoartritis (Gorman and Cope, 2008).

II.3.1. La artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es el ejemplo clásico de artritis inflamatoria y se considera un padecimiento crónico, sistémico y de origen autoinmune que afecta al 1% de la población a nivel mundial, de la cual, el 75% de los pacientes son mujeres (Scott, 2007). Su desarrollo puede involucrar la acción de factores genéticos, hormonales, ambientales y agentes estimulantes del sistema inmunitario (Gorman and Cope, 2008). Más aún, se acepta que después de ponerse en marcha la respuesta inflamatoria, esta continúa y se mantiene por eventos redundantes en los que participan células infiltradas al sinovio y a la cavidad articular (células T, B, macrófagos, etc.), así como células residentes del tejido sinovial (fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos tipo A y B, etc.) y el

cartílago (condrocitos) (Dayer, 2003; Paredes et al., 2002). Dichas células producen factores de inflamación con potente actividad catabólica (citocinas proinflamatorias, óxido nítrico, radicales libres, proteasas de matriz, etc), además de autoanticuerpos dirigidos contra moléculas endógenas (Song and Kang, 2010) (**Tabla 1**) que ponen en evidencia la condición autoinmune del padecimiento.

Tabla 1. Autoantígenos reconocidos en la AR [Extraída y modificada de Song y Kang, 2010 (Song and Kang, 2010)]

Origen/Naturaleza antigénica	Autoantígeno
Componentes del cartílago	Colágena tipo II (nativa y desnaturalizada)
Proteínas de estrés	Hsp65 microbiano, Bip
Proteínas nucleares	RA33/ hnRNP A2
Proteínas citrulinadas	Filagrina, fibrina, fibrinógeno, vimentina, colágena tipo I y II

La producción de factores inflamatorios perpetúa la respuesta inflamatoria favoreciendo el crecimiento hiperplásico del sinovio y la formación del *pannus*, la resorción del hueso subcondral, y la destrucción del cartílago articular.

II.3.2. La osteoartritis

La osteoartritis (OA) es la artropatía más común a nivel mundial (Furuzawa-Carballeda et al., 2008; Pelletier et al., 2001) y la principal causa de incapacidad en la edad avanzada (Goldring, 2006). Afecta respectivamente al 60% y 70% de los hombres y mujeres mayores de 65 años (Goldring, 2006), y se incrementa a 80% en la población mayor de 75 años (Arden and Nevitt, 2006). Más aún, el 6% de la población laboralmente activa (alrededor de 30 años de edad) también la padece (Hunter and Felson, 2006).

La OA resulta de un sistema complejo de interacciones mecánicas, biológicas y bioquímicas. Su desarrollo puede ser consecuencia de alteraciones genéticas y del inadecuado alineamiento articular, este último, ocasionado por defectos en el desarrollo y/o factores biomecánicos inestabilizantes (i.e.; uso articular acumulado o excesivo (ocupacional), y trauma) (Goldring, 2006). Las características histopatológicas del padecimiento incluyen esclerosis ósea (incremento anormal de la densidad del hueso), formación de osteofitos (protrusiones óseas), hiperplasia sinovial y formación de *pannus*, y la degradación y pérdida del cartílago articular (Furuzawa-Carballeda et al., 2008;

Goldring, 2006). Dichas afecciones están influenciadas por la acción de componentes inflamatorios producidos en el curso del padecimiento y cuya naturaleza es similar a la de la AR (Furuzawa-Carballeda et al., 2008).

II.3.3. Destrucción inflamatoria de la articulación

La destrucción articular en las artropatías inflamatorias involucra la degradación del cartílago, la hiperplasia sinovial, y la afectación del hueso. El cartílago está comprometido por el desgaste ocasionado por el uso articular, y es blanco de los componentes inflamatorios derivados de sí mismo, de la membrana sinovial en crecimiento y del hueso. Su destrucción ocurre como consecuencia de la degradación de su matriz, la disminución de la síntesis de nuevos componentes y la muerte de los condrocitos. La hiperplasia sinovial considerada como uno de los primeros eventos en la AR (Huber et al., 2006) y una característica histopatológica descrita recientemente en la OA (Furuzawa-Carballeda et al., 2008; Scanzello and Goldring, 2012), resulta de la inducción de la supervivencia y proliferación de los sinoviocitos, de la infiltración de células inmunocompetentes (provenientes de la circulación o de la médula ósea) y de la generación de nuevos vasos sanguíneos (Bartok and Firestein, 2010). La degradación inflamatoria del hueso está mediada por los osteoclastos que degradan al cartílago mineralizado y al hueso subcondral (Gravallese et al., 1998).

En general, la destrucción articular en las artropatías inflamatorias está dirigida por factores inflamatorios como la IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ , la IL-6, la IL-17, la IL-12, la IL-15, IL-23, etc., entre los cuales, los tres primeros sobresalen por sus efectos asociados a la promoción de autoinmunidad y la potencial influencia estimuladora sobre otros mediadores de inflamación.

Usando modelos animales de artritis inflamatoria se ha demostrado la participación de la IL-1 β , el TNF- α , y el IFN- γ en la artritis inflamatoria, y dichas evidencias se apoyan con efectos encontrados en pacientes humanos. El TNF- α está presente en el sinovio de pacientes con AR u OA (Chu et al., 1991), y su sobreexpresión en el ratón induce el desarrollo espontáneo de artritis acompañada de hiperplasia sinovial, erosión ósea, y degradación del cartílago (Butler et al., 1997; Keffer et al., 1991). Así mismo, las acciones de la IL-1 β también contribuyen al desarrollo de la artritis. El aumento de la IL-1 β

circulante en pacientes con AR se asocia con la severidad del padecimiento, y la eliminación genética del antagonista de su receptor (IL-1ra) en ratones BALB/cA induce la aparición espontánea de artritis poliarticular acompañada de sinovitis, erosión ósea, producción de auto-anticuerpos (anti: inmunoglobulinas, colágena tipo II, y DNA de doble cadena, etc.), e incremento de citocinas proinflamatorias (Horai et al., 2000). La IL-1 además es un mediador de la destrucción del cartílago, ya que en su ausencia, la sobreexpresión del TNF- α (IL-/-hTNFtg) no es suficiente para inducir la degradación del tejido aunque sí la inflamación sinovial (Zwerina et al., 2007). No obstante, la sinergia entre IL-1 y TNF- α se manifiesta por su presencia en el sinovio y en la unión cartílago-*pannus* [evaluado mediante inmunohistoquímica] de pacientes con AR u OA (Chu et al., 1991), y porque en el líquido sinovial de pacientes con dichas artropatías se detectan concentraciones patofisiológicas de ambas citocinas (1-10 ng/mL) (Schlaak et al., 1996; Westacott et al., 1990). Por otra parte, el uso de anticuerpos específicos contra el IFN- γ reduce la severidad de la artritis inducida por colágena tipo II en el ratón (Boissier et al., 1995).

Las acciones de la IL-1 β , el TNF- α , y el IFN- γ [conjunto de citocinas referido en adelante como Cit] promueven la infiltración de linfocitos, monocitos, neutrófilos, y macrófagos a la cavidad articular a través de estimular la producción de quimiocinas [específicamente de la proteína inducible de IFN- γ -10 (IP-10), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1a), la monocina inducida por IFN- γ (MIG), RANTES, y la interleucina-8 (IL-8) (Billiau and Matthys, 2009; Gouwy et al., 2005). Asimismo, la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) en el endotelio se incrementan en respuesta al IFN- γ , favoreciendo el reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación (Schroder et al., 2004). Más aún, el IFN- γ también favorece el desarrollo de autoinmunidad tras incrementar la expresión de la molécula MHC-II sobre células que normalmente no la expresan y en células presentadoras de antígeno, además de estimular la presentación de autoantígenos en células T autoreactivas (Billiau and Matthys, 2009) y de incrementar la eficiencia de la respuesta de los macrófagos a señales de daño detectadas por TLRs. Las acciones de Cit redundan dentro de la articulación estimulando su propia síntesis y la de otros factores de inflamación como la IL-6, la IL-17, el factor inhibidor de leucemia

(LIF), la prostaglandina E_2 (PGE_2), leucotrienos, la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), y el óxido nítrico (NO) (Berenbaum, 2000; Goldring, 2006; Hauselmann et al., 1998).

El NO es el principal mediador de los efectos de las Cit. Es de naturaleza soluble, vida corta, y su producción se incrementa en las artropatías inflamatorias. La principal enzima que lo produce bajo condiciones de inflamación es la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). La iNOS se sobreexpresa en el cartílago artrítico y el NO resultante aumenta en el suero y líquido sinovial de pacientes con OA y AR (Farrell et al., 1992; Sakurai et al., 1995) y en el sinovio (McCartney-Francis et al., 1993) y en la orina (Stichtenoth et al., 1994) de ratas con artritis experimental. Cabe mencionar que tanto las Cit como el NO son potentes inductores de metaloproteasas de matriz (MMPs) (Goldring, 2000), mediadoras a su vez de la degradación de la matriz extracelular del cartílago. Entre las MMPs involucradas en la digestión de las colágenas y los proteoglicanos se encuentran: la MMP-1 (Colagenasa tipo 1), la MMP-2 (Colagenasa tipo IV, 72KDa), la MMP-3 (Estromelisin-1), la MMP-9 (Colagenasa tipo IV, 92KDa), y la MMP-13 (Colagenasa tipo 3) (Burrage et al., 2006). Aunado a la degradación del cartílago dependiente de proteasas, los efectos directos de las Cit y del NO en la inducción de la apoptosis de los condrocitos (Kim et al., 2002; Olee et al., 1999) potencia la destrucción irreversible del cartílago articular.

El conocimiento de los efectos negativos de las citocinas proinflamatorias en la articulación artrítica ha permitido desarrollar terapias que mitigan la progresión de la artritis inflamatoria. Algunas de las terapias anti-citocinas empleadas en humanos están dirigidas contra el $TNF-\alpha$ y la $IL-1\beta$. Para contrarrestar los efectos del $TNF-\alpha$ se utiliza el *etanercept*, una molécula recombinante de la isoforma soluble de su receptor, y el *infliximab*, un anticuerpo monoclonal que secuestra a dicha citocina e inhibe sus acciones. Contra la $IL-1\beta$ se emplea *anakinra*, un antagonista recombinante de su receptor (Smith and Haynes, 2002). Dichas terapias proveen efectos terapéuticos pero sus efectos son parciales y/o efectivos solo en algunos pacientes, en los que además, suele desarrollarse resistencia a su uso.

En contra-parte a las terapias anti-citocinas, las artropatías inflamatorias se combaten también con fármacos que inhiben la activación del sistema inmunológico, por ejemplo la hidroxiclороquina, el metotrexato, la 6-mercaptopurina, la ciclosporina y la leflunamida entre otros (Smith and Haynes, 2002). Estos tratamientos mejoran la calidad de vida del paciente con artritis pero se acompañan de diversos efectos secundarios que pueden incluir la propensión a infecciones, fiebre, reacciones alérgicas, e hipotensión (Smith and Haynes, 2002).

Con este panorama, se mantiene la búsqueda continua de blancos y factores terapéuticos capaces de contrarrestar en general la progresión de la artritis inflamatoria, pero de combatir en particular los efectos adversos de las Cit sobre estructuras claves en el mantenimiento integral de la articulación. A este respecto, se ha hecho énfasis en la protección del cartílago articular inhibiendo la muerte inducida por inflamación del único tipo celular que lo conforma y que puede mitigar la destrucción articular.

II.3.4. La apoptosis de los condrocitos

La apoptosis de los condrocitos juega un papel importante durante el desarrollo, el envejecimiento, y las artropatías. En estas últimas, la apoptosis es un factor que limita el restablecimiento de la matriz y determina la destrucción del cartílago. En estudios *in vivo* se reporta un incremento en el número de los condrocitos apoptóticos en el cartílago con AR u OA (Hashimoto et al., 1998; Kim and Song, 1999; Kouri et al., 2000), condiciones bajo las cuales el cartílago es blanco de los factores inflamatorios derivados de sí mismo, del sinovio hiperplásico y del hueso. A este respecto, la IL-1 β , el TNF- β , y el IFN- γ administradas solas o en conjunto (Cit) inducen la apoptosis de condrocitos en cultivo (Adán, 2010; Schuerwegh et al., 2003) y este efecto proapoptótico se ha propuesto como uno de los mecanismos de la destrucción del cartílago (Schuerwegh et al., 2003) en razón tanto de sus acciones proapoptóticas directas como por su capacidad para estimular la producción de proteasas responsables de degradar los componentes de la matriz extracelular.

Uno de los principales mediadores de las acciones de Cit es el NO. Su adición a condrocitos en cultivo promueve su muerte por apoptosis, suprime la síntesis de colágenas y proteoglicanos, e incrementa la síntesis de MMPs (Lotz, 1999). Por su parte,

la inhibición farmacológica de la actividad de la iNOS bloquea los efectos proapoptóticos de Cit sobre condrocitos en cultivo (Adán, 2010). Más aún, la muerte de los condrocitos en pacientes con AR y OA se correlaciona directamente con la presencia de NO en el suero y en el líquido sinovial (Clancy et al., 2004). Los efectos del NO sobre los condrocitos parecen involucrar la activación de la proteína p53 (Wang et al., 2007), cuya expresión se incrementa en el cartílago artrítico (Hashimoto et al., 1998), y cuya inhibición abate la apoptosis condrocitaria inducida por la IL-1 β (Csaki et al., 2008). La participación de la p53 en la mediación de la apoptosis de condrocitos puede obedecer a su capacidad para incrementar los cocientes entre la proteína proapoptóticas Bax y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL a niveles capaces de promover la activación de la caspasa-3, que a su vez induce la activación de DNAsas responsables de mediar la fragmentación nucleosomal del ADN característica del proceso apoptótico.

En línea con lo anterior, se ha considerado que la promoción de la supervivencia de los condrocitos podría fungir como estrategia para abatir la destrucción del cartílago articular y, por ende, proteger contra las artropatías. Un factor con posibilidades terapéuticas para inhibir la muerte de los condrocitos en la artritis inflamatoria es la hormona prolactina, una hormona con propiedades antiapoptóticas, presente en el líquido sinovial y específicamente en el cartílago articular.

II.4. La prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica conocida fundamentalmente por su efecto lactogénico en los mamíferos, y cuya producción ocurre principalmente en los lactotropos, células especializadas de la adenohipófisis que comprenden entre el 20 y el 50% del total celular de dicha glándula (Ben-Jonathan et al., 1996; Freeman et al., 2000). Además de su síntesis hipofisiaria, la PRL es producida por diversos tejidos extrahipofisarios que incluyen células del sistema nervioso, del tejido linfóide, del endotelial vascular, del epitelio mamario, y del cartílago articular (Ben-Jonathan et al., 1996; Corbacho et al., 2002; Macotela et al., 2006). Consistentemente, la PRL está presente en diversos fluidos biológicos incluyendo el suero, las lágrimas, la leche, el sudor, el fluido folicular ovárico, y los líquidos cerebrospinal, amniótico, y sinovial (Bole-Feysot et al., 1998; Ogueta et al., 2002).

Además de la función lactogénica de la PRL, se han descrito a detalle funciones elementales sobre otros eventos fisiológicos dentro y fuera de la reproducción que incluyen acciones sobre el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo, la conducta, la inmunomodulación, el balance de electrolitos, y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996; Corbacho et al., 2002).

La PRL posee una masa molecular de 23 kDa en el humano y su diversidad funcional puede depender de modificaciones postraduccionales que tienen lugar sobre su molécula como son la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis (Ben-Jonathan et al., 1996; Sinha, 1995), aunque también puede influir la heterogeneidad molecular de su receptor. Existen tres isoformas del receptor a PRL generadas a partir del procesamiento alternativo de un transcrito primario. Dichas isoformas difieren en la extensión de su dominio citoplasmático y definen una isoforma corta (42 kDa), una intermedia (65 kDa), y una larga (80 kDa) (Boutin et al., 1988). La isoforma larga (RPRL) es a través de la cual la PRL ejerce la mayoría de sus efectos.

El RPRL es considerado un miembro de la superfamilia de receptores a citocinas clase 1 (Bole-Feysot et al., 1998), y consta de una sola estructura transmembranal que carece de actividad enzimática intrínseca (Goffin et al., 2005). A razón de esto, el RPRL transduce sus señales a través de cinasas asociadas que fosforilan y activan a una variedad de proteínas celulares, incluyendo al mismo receptor (Bachelot and Binart, 2007; Goffin et al., 2005). Entre las cinasas de tirosina y de serina/treonina asociadas al RPRL se incluyen la Janus cinasa 2 (JAK2), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), y la cinasa de tirosina relacionada con la oncoproteína del virus de sarcoma de Rous (Src cinasa), las cuales inician cascadas específicas de señalización (Goffin et al., 2005) (**Fig. 5**). JAK2/STATs (transductores y activadores de la transcripción) es la vía canónica de señalización activada por PRL (Freeman et al., 2000; Goffin et al., 2005).

La unión de la PRL a una molécula del receptor aumenta la afinidad de otra molécula del receptor para unirse a un segundo sitio de unión en la molécula de PRL. La dimerización de dos moléculas del receptor con una molécula de PRL induce la fosforilación en residuos de tirosina y la consecuente activación de una JAK2 membranal. La JAK2 así activada fosforila residuos de tirosina en el receptor de PRL y esto les permite actuar

como sitios de anclaje para STATs que pueden entonces ser también fosforiladas/activadas por JAK2. Las STATs fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo, donde se unen a secuencias consenso en el ADN denominadas GAS (secuencias de activación de IFN- γ) y activan la transcripción génica (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 1999) (**Fig. 5**).

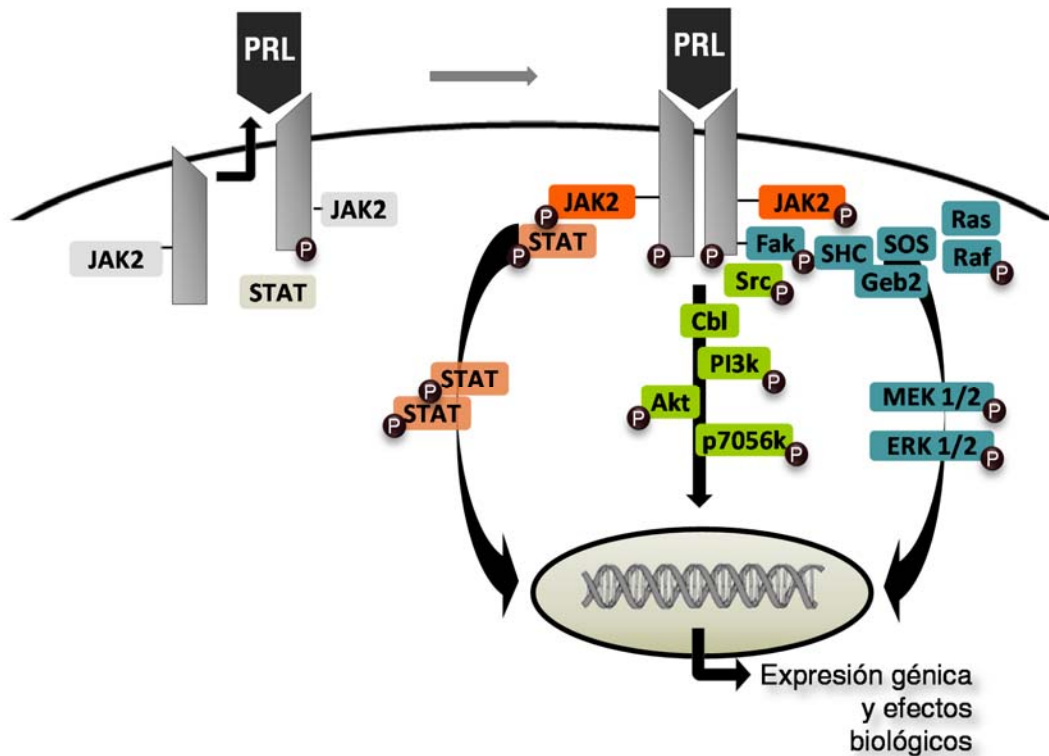


Figura 5. Activación del sistema PRL/RPRL. Se ejemplifica [de izquierda a derecha] la dimerización del receptor a PRL con la activación de la vía canónica de transducción de señales JAK2/STATs, y otras vías de señalización activadas por la hormona a través de la isoforma larga de su receptor. En naranja; vía de señalización JAK2/STATs, en verde; vía PI3K/Akt, y en azul; vía de las MAPK. JAK2; Janus cinasa 2, STATs; transductores y activadores de la transcripción, PI3K; fosfatidilinositol 3 cinasa, Akt; cinasa de serina/treonina, MAPK; proteína cinasa activada por mitógeno. Basado en Goffin y col., 2005 (Goffin et al., 2005).

La señalización inducida por la PRL promueve eventos celulares entre los que se incluyen la proliferación (Olazabal et al., 2000), la diferenciación (Ogueta et al., 2002) y la supervivencia celular (Krishnan et al., 2003; Tessier et al., 2001; Zermeno et al., 2006). En relación a esta última se ha reportado que la PRL inhibe la apoptosis de células del

epitelio mamario (Humphreys and Hennighausen, 1999), de la decidua uterina (Tessier et al., 2001) y del tejido linfoide (linfocitos T) (Krishnan et al., 2003) a través de activar a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) que fosforila/activa a la cinasa de serina/treonina, Akt (Tessier et al., 2001). Esta activación resulta en la expresión de los genes antiapoptóticos Bcl-2, Pim-1, y XIAP y en la inhibición de la expresión y activación de la caspasa-3 (Krishnan et al., 2003; Tessier et al., 2001).

En cuanto al efecto antiapoptótico de la PRL sobre condrocitos articulares, nuestro laboratorio ha evidenciado su capacidad para inhibir la apoptosis de los condrocitos en cultivo inducida por la disminución de la concentración de suero (Zermeno et al., 2006) o mediante el tratamiento con Cit (Adán, 2010), sin embargo, los mecanismos de acción que median dichos efectos se desconocen. A este respecto se ha mostrado que la activación de la STAT3 promueve la supervivencia de los condrocitos de la placa de crecimiento a través de un mecanismo dependiente de la transcripción de Bcl-2 (Suemoto et al., 2007). Estos efectos condroprotectores de la STAT3 y el hecho de que la PRL activa de manera canónica a la vía JAK2/STATs, sugiere que JAK2/STAT3 pudiera mediar los efectos antiapoptóticos de la PRL en el cartílago.

Por otro lado, a sabiendas de que los efectos de la PRL están influenciados por modificaciones postraduccionales en su molécula, y que la modificación causada por el procesamiento proteolítico de la hormona se favorece en un ambiente inflamatorio rico en proteasas, fue de particular interés evaluar si la supervivencia de los condrocitos estaba influenciada por una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la PRL conocidos como vasoinhibinas, presentes en el cartílago, y con efectos proapoptóticos (Ferraris et al., 2011; Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003).

II.5. Las vasoinhibinas

Las vasoinhibinas (Vi) constituyen una familia de péptidos metabólicamente activos que derivan de la proteólisis de la PRL, la hormona de crecimiento, y el lactógeno placentario, y corresponden a la región amino terminal de dichas hormonas. La generación de las Vi a partir de la PRL resulta del corte proteolítico mediado por MMPs (Macotela et al., 2006), la catepsina-D (Baldocchi et al., 1993; Piwnica et al., 2004), y la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (BMP-1) (Ge et al., 2007) (**Fig. 6**).

Las Vi están presentes en la circulación (Torner et al., 1995) y se producen en la adenohipófisis (Cruz-Soto et al., 2009) además de sitios extrahipofisarios incluyendo el endotelio vascular (Corbacho et al., 2000), el hipotálamo (Clapp et al., 1994), la retina (Aranda et al., 2005) y el cartílago articular (Macotella et al., 2006).

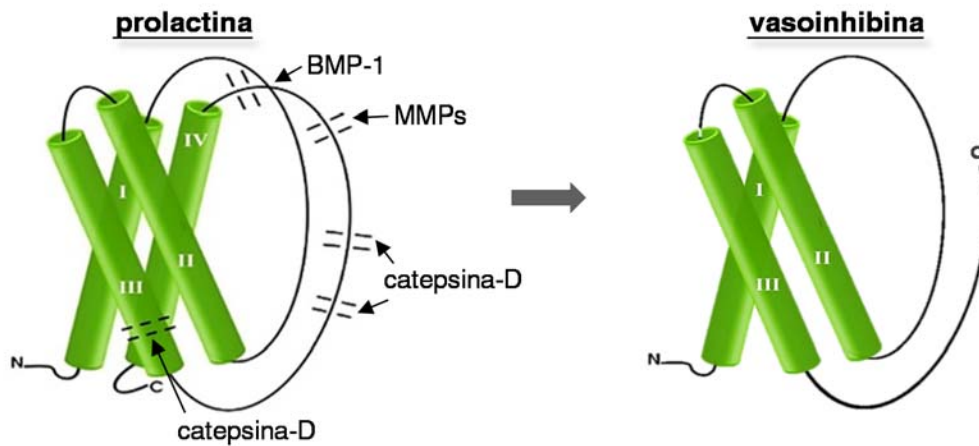


Figura 6. Generación de vaso inhibinas a partir del corte proteolítico de la PRL. Se ilustra la conformación de la PRL de 23 kDa con los sitios de corte para MMPs, catepsina-D y la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (BMP-1), así como el segmento correspondiente de la región amino terminal de la hormona conocido como vaso inhibina. Extraína y modificada de Clapp y col., 2008 (Clapp et al., 2008b).

Las acciones más estudiadas de las Vi son las relacionadas con la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis). Se ha descrito su capacidad para inhibir la proliferación, migración, capilarización y supervivencia de las células endoteliales (Martini et al., 2000). Además, las vaso inhibinas inhiben la dilatación y permeabilidad vascular (Clapp et al., 2006; Clapp et al., 2008a). Estas acciones involucran el arresto del ciclo celular en G_0 y G_2 que resulta de la inhibición de las ciclinas D1 y B1 y de la estimulación de inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas p21 (cip1) y p27 (kip1) (Tabruyn et al., 2003). Se conoce que las vaso inhibinas inhiben la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) a nivel de RAS (D'Angelo et al., 1999) y que estimulan la apoptosis de las células endoteliales a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B que induce a la proteína proapoptótica Bcl-xS y la activación de las caspasas-8 y 9 (Aigner and

McKenna, 2002; Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003). Se ha propuesto que las vasoinhibinas participan en la inhibición natural de la angiogénesis que tiene lugar en ciertos órganos como la córnea (Duenas et al., 1999) y en la retina (Aranda et al., 2005), donde se han detectado a las vasoinhibinas y su inmunoneutralización resulta en angiogénesis. Interesantemente, también se ha detectado a las vasoinhibinas en el cartílago articular (Macotella et al., 2006), que como se mencionó es un tejido avascular.

En contraparte a los efectos antiangiogénicos de las Vi, la PRL tiene efectos estimulatorios sobre la angiogenesis; promueve la producción de factores proangiogénicos por el epitelio mamario (Clapp et al., 2008b), e induce la proliferación de células endoteliales en el cuerpo lúteo (Gaytan et al., 1997), el testículo (Ko et al., 2003), y el miocardio (Hilfiker-Kleiner et al., 2007).

Además de la angiogénesis, el antagonismo funcional entre las acciones de la PRL y las Vi se pone en evidencia también bajo condiciones de inflamación. En fibroblastos de pulmón [células importantes para los procesos inflamatorios en las vías aéreas] por ejemplo, la PRL y las Vi ejercen efectos antiinflamatorios y proinflamatorios, respectivamente. La PRL inhibe la expresión de la iNOS y la producción de NO inducidas por las Cit (Corbacho et al., 2003), mientras que las Vi las promueven con una potencia similar a la de las Cit (Corbacho et al., 2000). Dado a que el NO es uno de los principales promotores de la apoptosis de los condrocitos bajo condiciones de inflamación, es posible que el antagonismo funcional de la PRL y las Vi sobre la supervivencia de los condrocitos fuera mediado a través de las acciones opuestas de ambos péptidos sobre la activación de la iNOS y la producción de NO. Este es un evento posible, dado que la inflamación propicia un microambiente que favorece la acción de enzimas proteolíticas (MMP) que además de degradar al cartílago tienen la capacidad de procesar a la PRL hacia Vi.

II.6. Efecto de la PRL sobre el cartílago articular y la posible implicación de las Vi

Tanto la PRL como las Vi están presentes en la circulación (Torner et al., 1995), son producidas en la adenohipófisis (Cruz-Soto et al., 2009) y en sitios extrahipofisarios incluyendo al cartílago articular (Macotella et al., 2006).

Hay evidencias de que las células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea expresan a la PRL durante su diferenciación condrocitaria (Aigner and McKenna, 2002), y que sobre estas células en diferenciación la PRL estimula su propia expresión, la producción de colágena tipo II y de proteoglicanos, e induce la organización de los condrocitos en columnas longitudinales cuando se combina con glucocorticoides (Ogueta et al., 2002). La relevancia funcional de la PRL sobre los condrocitos se sugiere por la presencia del sistema PRL/ RPRL en el cartílago adulto (Macotela et al., 2006; Zermeno et al., 2006) y del RPRL incluso desde el desarrollo fetal (Freemark et al., 1997; Tzeng and Linzer, 1997). Sin embargo, la acción de la hormona no parece ser indispensable para la supervivencia condrocitaria bajo condiciones normales, ya que la delección genética de su receptor no presenta un fenotipo alterado en dicho tejido (Adán, 2008; Adan et al., 2013).

Por otro lado, la PRL ha sido relacionada con la patofisiología de la AR. Al respecto, el interés por la PRL surgió debido al dimorfismo sexual que presenta la AR a favor de las mujeres, dado que los niveles de PRL son más altos en el sexo femenino (Yamaji et al., 1976). Interesantemente, se han reportado niveles elevados de PRL en el suero (Mateo et al., 1998; Serio et al., 2002) y en el líquido sinovial (Nagafuchi et al., 1999; Ogueta et al., 2002) de pacientes con AR, si bien la relación entre el incremento de la PRL circulante y la gravedad del padecimiento es controversial. Por ejemplo, en un estudio reciente con 307 pacientes con AR, cuatro de ellos que presentaron niveles de PRL sérica superiores a los basales (> 637 mIU/L para mujeres; > 456 mIU/L para hombres) mostraron menor actividad del padecimiento respecto al resto (Haga et al., 2014). Sin embargo, en otros estudios se observó una correlación moderada entre la actividad de la AR y el nivel de la PRL en el líquido sinovial (Fojtikova et al., 2010) pero no en el suero (Haga et al., 2014).

Los antecedentes más directos que muestran efectos protectores de la PRL contra la destrucción del cartílago articular bajo condiciones de inflamación fueron obtenidos por nuestro laboratorio. Como parte de mi tesis de licenciatura, encontré que la inyección intra-articular de Cit induce un efecto proapoptótico mayor en el cartílago articular del ratón desprovisto del RPRL (*rpr^{-/-}*) que en el del ratón silvestre (*rpr^{+/+}*) (Adán, 2008; Adan et al., 2013). En otra tesis experimental de nuestro grupo, se observó que el efecto

proapoptótico sobre los condrocitos de la inyección intra-articular de Cit en la rata es abatido por el incremento de la PRL circulante o por la administración conjunta de una dosis farmacológica de la hormona (Guzmán-Morales, 2008).

Cabe mencionar que la resultante final de los efectos de la PRL podría estar supeditada a su conversión proteolítica a Vi. El cartílago articular produce MMP capaces de procesar eficientemente a la PRL generando Vi bajo condiciones fisiológicas (Macotella et al., 2006). En este sentido, dados los efectos antiangiogénicos de las Vi, su presencia y generación en el cartílago normal podría contribuir al mantenimiento de la condición avascular del tejido. Sin embargo, en la artritis inflamatoria la producción y activación de MMP se incrementa en respuesta a citocinas proinflamatorias (Breedveld, 2004; Goldring, 2000; Sandell and Aigner, 2001) pudiendo favorecer la generación de Vi. Una mayor producción de Vi podría representar una situación en la que las acciones de dichos péptidos sobrepasen los efectos fisiológicos, y tomen lugar efectos adversos como la promoción de la apoptosis en el cartílago. En mi tesis de maestría obtuve resultados que muestran que las Vi promueven la apoptosis de los condrocitos *in vitro* (Adán, 2010). De tal manera, resulta importante caracterizar los efectos proapoptóticos de las Vi y si la generación de estas se incrementa bajo condiciones de inflamación, por ejemplo, por acción de las Cit.

III. JUSTIFICACIÓN

III.1. Primera (sobre la evaluación de los efectos de la PRL)

La PRL protege a los condrocitos en cultivo contra la apoptosis inducida por el tratamiento con Cit (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) pero se desconoce el mecanismo por el cual la hormona ejerce sus acciones condroprotectoras. Asimismo, la PRL inhibe la muerte de los condrocitos articulares inducida por la inflamación aguda generada por las Cit inyectadas intra-articularmente, pero se desconoce si sus efectos condroprotectores se extienden a condiciones de inflamación crónica como la artritis inflamatoria. Dicho estudio además, ayudará a dilucidar al menos en parte, el papel de la PRL en este tipo de padecimientos. En este sentido se planteó evaluar mediante experimentos *in vitro* a algunos de los elementos implicados en la condroprotección mediada por PRL, y determinar *in vivo* si el incremento de la PRL circulante, previene y/o mitiga la muerte de los condrocitos en el modelo de artritis inflamatoria inducida por adyuvante.

III.2. Segunda (sobre la evaluación de los efectos de las Vi)

Las Vi resultan de la proteólisis de la PRL, y los condrocitos producen fisiológicamente proteasas (MMPs) capaces de procesar eficientemente a la hormona. Dado que bajo condiciones de inflamación el nivel de proteasas aumenta, es posible que el procesamiento de la PRL hacia las Vi se incremente, modificando así el efecto final de la PRL en estas condiciones. No ha sido reportada la generación de Vi a partir de la PRL bajo condiciones de inflamación articular, y no han sido caracterizados los efectos proapoptóticos de las Vi sobre los condrocito. En este sentido se planteó investigar si el tratamiento con Cit *in vitro* e *in vivo* favorece la generación de Vi, así como re-evaluar la acción proapoptótica de las Vi sobre los condrocitos en cultivo, y determinar algunos de los mecanismos implicados. La generación de evidencias sobre la generación de las Vi bajo condiciones de inflamación y sus mecanismos para inducir la muerte de los condrocitos, será beneficiosa para entender mejor la tasa de muerte/supervivencia de este tipo celular bajo condiciones de inflamación y en presencia de PRL.

IV. HIPÓTESIS

1. La PRL protege a los condrocitos en cultivo contra la apoptosis inducida por el tratamiento con Cit (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), mediante un mecanismo dependiente de la inhibición de la iNOS y de la producción de NO y de la inducción/activación de la vía JAK2/STAT3, y sus efectos condroprotectores se extienden a condiciones de inflamación crónica abatiendo la muerte de los condrocitos articulares en el modelo de artritis inducida por adyuvante.
2. La proteólisis de PRL hacia Vi se favorece bajo condiciones de inflamación inducida por Cit tanto *in vitro* como *in vivo*, y sus efectos proapoptóticos sobre condrocitos en cultivo involucran la inducción de la expresión de la iNOS y la producción de NO.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivos generales

1. Evaluar los mecanismos de acción de la PRL involucrados en la inhibición de la apoptosis condrocitaria inducida por el tratamiento con Cit (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ).
2. Evaluar el efecto de la hiperprolactinemia en la apoptosis del cartílago articular en la artritis inducida por adyuvante.
3. Evaluar si la inflamación inducida por el tratamiento con Cit tanto *in vitro* como *in vivo* inducen la generación de Vi a partir del procesamiento de PRL.
4. Evaluar los mecanismos de acción de las Vi involucrados en la inducción de apoptosis de los condrocitos en cultivo.

V.2. Objetivos particulares

1. Evaluar si el efecto antiapoptótico de PRL sobre la apoptosis de condrocitos inducida por Cit ocurre en respuesta a dosis óptimas de la hormona (efecto de una curva de concentraciones de PRL).
2. Evaluar si en sus acciones condroprotectoras la PRL induce a la proteína antiapoptótica Bcl-2, e inhibe a las proteínas proapoptóticas Bax, p53, y caspasa-3 inducidas por Cit.
3. Evaluar si uno de los mecanismos por los cuales la PRL ejerce sus acciones condroprotectoras involucra la inhibición de la iNOS y el NO.
4. Evaluar si la vía de señales JAK2/STAT3 activada canónicamente por la PRL está involucrada en la supervivencia de los condrocitos inducida por la hormona.
5. Evaluar si la hiperprolactinemia previene la apoptosis de los condrocitos articulares en la artritis inducida por adyuvante.
6. Evaluar si la hiperprolactinemia abate la apoptosis de los condrocitos articulares una vez establecida la artritis inducida por adyuvante.
7. Evaluar si el tratamiento de condrocitos en cultivo con Cit induce el procesamiento proteolítico de la PRL [administrada exógenamente como sustrato] hacia Vi.
8. Evaluar si las Cit inyectadas intra-articularmente en el ratón *rprt^{-/-}* inducen la generación de Vi detectables en el suero.

9. Evaluar si el efecto proapoptótico de las Vi sobre condrocito en cultivo involucran la inducción de las proteínas proapoptóticas Bax, Bcl-xS, p53, y caspasa-3, y si su mecanismo de acción es dependiente de la vía iNOS/NO.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Materiales

VI.1.1. Reactivos

Se emplearon las citocinas recombinantes humanas IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ obtenidas de R&D Systems. Las vasoinhibinas recombinantes humanas (Vi) fueron generadas por mutagénesis dirigida a partir del ADN complementario de la PRL humana (Galfione et al., 2003). La PRL recombinante humana fue generada en *Escherichia coli* y proveída por Michael E. Hodsdon (Universidad de Yale, New Haven, CT.). La PRL de rata fue adquirida del “Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis” de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NHPP, NIH, Torrance, CA.) y A.F. Parlow. La PRL ovina y el L-NAME (N ω -nitro-L-arginina metil éster) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, y el inhibidor de STAT3 (S31-201) y los anticuerpos anti-Bax (Sc-493) y anti-Bcl-2 (Sc-492) de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-caspasa-3 (9662) y anti-pJAK2 (Tyr1007/1008, 3771) se obtuvieron de Cell Signaling Technology, el anti-iNOS (06-573) de Upstate, y el adyuvante completo de Freund's (ACF) de Difco.

VI.1.2. Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (130-150 g) y Sprague-Dawley (200-250 g), así como ratones macho (6-8 meses de edad) de la cepa 129Svj silvestres (*rprt^{+/+}*) o carentes del receptor de PRL (*rprt^{-/-}*). Los ratones *rprt^{-/-}* contienen al gen de neomicina que sustituye a un fragmento de 1.5 kb en el exón 5 del RPRL y esencial para su función (Ormandy et al., 1997). Durante el protocolo de investigación los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio (22°C; 12-h/12-h luz/oscuridad; libre acceso a comida y agua), y las cirugías e inyecciones intra-articulares se realizaron bajo anestesia con ketamina-xilacina (70%:30%, 1 μ L/g peso, i.p.) entre las 9:00 am y las 12:00 pm. Para evitar efectos del estrés, los animales fueron manipulados [para su habituación] durante 5 días previos a su experimentación o al sacrificio. El sacrificio se realizó bajo anestesia con dióxido de carbono y decapitación.

VI.2. Métodos

VI.2.1. Aislamiento y cultivo de condrocitos

El cartílago fue obtenido de los cóndilos femorales y de las placas femoro-tibiales de ratas Wistar siguiendo el método previamente establecido (Macotela et al., 2006). El cartílago obtenido en trozos fue digerido en solución A (1.8 g glucosa, 0.22g KCl, 7.59 g NaCl y 0.745 g Na₂HPO₄, en 1L de agua; pH 7.3-7.4) con 0.025% de tripsina durante 10 minutos a temperatura ambiente (T_{amb}) con agitación. Posteriormente, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min para sustituir la solución de tripsina por solución A con 0.020% de colagenasa tipo II, en la que se incubaron durante 2 h a 37°C y agitación. La digestión fue filtrada a través de una malla con espacios de 50 µm para separar las células de los fragmentos de tejido no digerido. El paquete celular fue centrifugado, resuspendido, y sembrado a la densidad requerida por el experimento en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, BRL) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina/estreptomicina a 37°C en una atmósfera con 95% de aire - 5% de CO₂. Pasadas al menos 12 h, se removieron las células no adheridas y el resto fue re-incubado en medio fresco sin o con tratamiento. Los tratamientos consistieron en la administración de una mezcla de citocinas (Cit) constituida por TNF-α (25 ng/mL), IL-1β (10 ng/mL), e IFN-γ (10 ng/mL) en combinación o no con diferentes concentraciones de PRL de rata (0.023, 0.230, y 2.3 µg/mL), o el inhibidor de las NOS L-NAME (1 mM). Otros cultivos celulares fueron incubados con el inhibidor de STAT3 S31-201 (100 nM), Vi (100 nM), o PRL recombinante humana (5 µg/mL). Todos los experimentos fueron realizados al primer pasaje del cultivo.

VI.2.2. Evaluación de apoptosis mediante ELISA

Condrocitos sembrados a una confluencia de 2×10^5 / 250 µL DMEM 10% SFB en placas de 48 pozos fueron incubados durante 24 h con los siguientes tratamientos; Cit en ausencia o presencia de distintas dosis de PRL de rata (0.023, 0.230, y 2.3 µg/mL) o 1 mM de L-NAME, o 100 nM de Vi. Los medios condicionados fueron recuperados y centrifugados durante 8 min a 3.6×1000 rpm. El medio sin células fue conservado a -70 °C hasta la cuantificación del NO mediante Griess, y las células obtenidas del medio y de la placa se lisaron en 300 µL de una solución para lisis [proveída en el estuche

comercial] durante 30 min a T_{amb} . Los lisados celulares fueron centrifugados a 13.2 x 1000 rpm durante 8 min, se rescataron 200 μ L del sobrenadante conteniendo los nucleosomas, y se conservaron a -20 °C hasta el ensayo. La valoración de apoptosis por ELISA [usando el estuche comercial de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania] consiste en la detección de las histonas y el ADN expuestos en los fragmentos nucleosomales con anticuerpos específicos para cada componente. Para ello se incubó una placa de 96 pozos con 50 μ L/pozo del anticuerpo anti-histona diluido 1:10 en solución de recubrimiento durante 1 h a T_{amb} . Posteriormente se lavó la placa e incubó con 50 μ L/pozo de solución de incubación durante 30 min. Seguido de otro lavado se adicionaron 50 μ L/pozo de la muestra problema diluida 1:10 en solución de incubación durante 90 min a T_{amb} . Mediante lavado se removió el contenido de la placa y se adicionaron 50 μ L/pozo el anticuerpo anti-ADN diluido 1:10 en la solución de incubación por 90 min a T_{amb} . Una vez lavada la placa se adicionaron 50 μ L de solución de sustrato e incubó de 10-20 min. Finalmente se evaluó el desarrollo colorimétrico de la reacción en un lector de placas a 490 nm – 405 nm.

VI.2.3. Western blot de proteínas en lisados celulares

Condrocitos sembrados a una confluencia de 1×10^6 / mL DMEM 10% SFB en placas de 6 pozos fueron tratados con Cit en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata, o 100 nM de Vi. La duración del tratamiento fue dependiente de la proteína a evaluar. Para los ensayos de fosforilación, los condrocitos fueron incubados con medio DMEM 0.5% SFB durante y desde 1 h previa al tratamiento. La fosforilación de JAK2 se evaluó después de 30 min, la expresión de Bax y Bcl-2 después de 4 h, y la caspasa-3 total (procaspasa-3 y caspasa-3 activa) y la iNOS después de 6 h de tratamiento. Las células fueron resuspendidas en solución de lisis (0.5% Igepal, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 μ g/mL aprotinina, y 100 μ g/mL PMSF, pH 7.0), y 40 μ g de proteína total fueron sujetos a SDS/PAGE, y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con PBS – 0.5%Tween-20 – 1% leche durante 1 h, y en seguida incubadas con anticuerpos anti-caspasa-3, anti-iNOS, o anti-pJAK2 diluidos 1:1000, anti-Bax diluido 1:300, o anti-Bcl-2 diluido 1:200, durante una noche a 4 °C. Las proteínas de interés fueron reveladas en las membranas con anticuerpos secundarios conjugados al

enzima fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) y el estuche comercial que contiene el sustrato para dicha enzima (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las mediciones densitométricas se realizaron con el software para análisis de imágenes Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

VI.2.4. Valoración de nitritos y nitratos mediante el ensayo de Griess

Condrocitos sembrados a una confluencia de 2×10^5 / 250 μ L DMEM 10% SFB en placas de 48 pozos fueron tratados durante 24 h con Cit en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata, o 100 nM de Vi. Las células fueron destinadas para la evaluación de apoptosis mediante ELISA, y los medios para la valoración de los niveles de NO mediante Griess. El ensayo de Griess determina la producción de NO a través de la valoración de los nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) obtenidos por la reducción del NO con el enzima nitrato reductasa. Para el ensayo se elaboró una curva de calibración de NO_3^- (0-200 μ M) en medio DMEM con 10% de SFB. Se preparó una solución de inicio (50% HEPES pH 7.5, 25% formato de amonio (FA) 2.4 M pH 7.2, y 25% de agua destilada) a la que se adicionaron 50 μ l de reductasa de *Escherichia coli* por cada 2 mL de dicha solución. En breve se mezclaron 100 μ L de la solución de inicio con 100 μ L de cada uno de los medios condicionados o de cada uno de los puntos de la curva de NO_3^- , se incubaron durante 1h a 37° C, y se centrifugaron durante 3 min a 13,000 rpm. De la reacción se tomaron y transfirieron 100 μ L a una placa de 96 pozos, donde se les adicionó 100 μ L del reactivo de Griess (1% Sulfanilamida, 0.1% NEDA, 3% de ácido fosfórico, en agua destilada). El cambio colorimétrico de la reacción fue cuantificado en espectrofotómetro a 490 nm.

VI.2.5. Inmunocitoquímica para la detección de STAT3

Para investigar la translocación de la proteína STAT3 hacia el núcleo en respuesta al tratamiento con Cit en ausencia o presencia de PRL, 4×10^5 condrocitos fueron sembrados sobre cubreobjetos de vidrio (18 mm de diámetro) cubiertos con fibronectina (10 μ g/mL) en placas de 12 pozos. Las Cit en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata fueron administradas durante 1 h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con 100% metanol durante 20 min a -20 °C. Enseguida fueron

incubadas durante 1 h en PBS - 0.05% Triton - 5% suero normal de cabra, para adicionar después el anticuerpo anti-STAT3 total diluido 1:100 en PBS - 0.05% Triton. Transcurrida una noche de incubación a 4 °C con dicho anticuerpo, las células fueron lavadas e incubadas durante 2 h a T_{amb} con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 (Invitrogen, Eugene, OR) diluido 1:500 en PBS - 0.05% Triton. El núcleo fue contra teñido con DAPI (1 µg/mL; Sigma-Aldrich). Las preparaciones fueron colocadas sobre portaobjetos usando Vectashield como medio de montaje y barniz de uñas como sellador. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio confocal Zeiss Meta-Multifotónico (Axiovert 200 LSM 510).

VI.2.6. Desarrollo de artritis inducida por adyuvante (AIA)

La artritis inducida por adyuvante se generó tras la inmunización de ratas Sprague-Dawley con la inyección intradérmica de 0.2 mL de ACF (10 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inactivado por calor en 1 mL de adyuvante de Freund's) en la base de la cola. Los efectos de la PRL sobre la apoptosis de los condrocitos articulares en este modelo se evaluaron bajo dos protocolos de investigación. Un **protocolo preventivo** en el que tres días previos a la inmunización los animales fueron implantados subcutáneamente con una tableta de haloperidol (modelo de liberación; 60 días) conteniendo 35 mg de haloperidol (Innovative Research of America, Sarasota, FL), o con una minibomba osmótica Alzet (modelo de liberación; 28 días) (Alza, Palo Alto, CA) conteniendo un total de 1.6 mg de PRL ovina. Un **protocolo curativo** en el que 15 días posteriores a la inmunización [cuando los signos del padecimiento son evidentes] los animales fueron implantados con una minibomba osmótica Alzet (modelo de liberación; 14 días) conteniendo un total de 0.8 mg de PRL ovina. La efectividad del padecimiento fue valorado por el incremento de la circunferencia del tobillo evaluado mediante el registro con vernier digital de 2 diámetros perpendiculares, el diámetro latero-lateral (**a**) y el antero-posterior (**b**), y la fórmula: circunferencia = $2\pi(\sqrt{(a^2+b^2)}/2)$. Los animales fueron sacrificados al día 21 post-inmunización. La sangre fue recuperada para valorar los niveles de PRL circulante, y las extremidades posteriores [rodilla y tobillo] fueron disectadas. La articulación de rodilla fue fijada, decalcificada y deshidrata para ser embebida en parafina, y utilizada para la evaluación de la apoptosis *in situ*. Los tobillos

fueron pulverizados para evaluar la expresión de marcadores proapoptóticos mediante qRT-PCR.

VI.2.7. Evaluación de apoptosis *in situ* mediante TUNEL

El ensayo de TUNEL usa como herramienta al enzima deoxinucleotidiltransferasa para unir nucleótidos marcados con fluoresceína al grupo hidroxilo libre en la posición 3' del ADN fragmentado. A mayor fragmentación del ADN mayor es la cantidad de nucleótidos unidos y en consecuencia mayor intensidad de fluorescencia. Para el ensayo se utilizó el estuche comercial para detección de apoptosis *in situ* (Roche Diagnostics). Secciones de rodillas embebidas en parafina con un grosor de 7- μ m se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 y 0.1% citrato de sodio durante 7 min, seguido de su incubación en una solución de citratos (citrato de sodio 10 mM, 0.5% Tween 20, pH 6.0) por 1 min a 86°C. Enseguida se incubaron con PBS – 0.05% Tween-20 – 0.1% BSA - 1% suero normal de cabra durante 30 min a T_{amb} . Posteriormente, se administraron 50 μ L de una mezcla del enzima con nucleótidos durante 1 h. Finalmente, las preparaciones fueron lavadas con PBS y cubiertas con un cubreobjetos usando Vectashield como medio de montaje y barniz de uñas como sellador. La señal de apoptosis se visualizó bajo un microscopio de fluorescencia (Microscope BX60F5, Olympus Optical Co., LTD, Japón) y cuantificada con el software para análisis de imágenes Image Pro-Plus™ (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD).

VI.2.8. Inmunohistoquímica para la detección de la caspasa-3 activa

Secciones de 7- μ m de grosor fueron desparafinadas, rehidratadas y permeabilizadas con 0.1% Triton X-100 y 0.1% citrato de sodio durante 7 min, seguido de su incubación en una solución de citratos (citrato de sodio 10 mM, 0.5% Tween 20, pH 6.0) por 1 min a 86°C. Las preparaciones fueron incubadas inmediatamente con PBS – 0.05% Tween-20 – 0.1% BSA – 1% suero normal de cabra durante 30 min a T_{amb} , para su posterior incubación con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa (1:25; Millipore, Temecula, CA) durante una noche a 4 °C. En seguida las preparaciones fueron lavadas con PBS, incubadas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 (1:500) durante 2 h a T_{amb} , y finalmente cubiertas con un cubreobjetos usando Vectashield como medio de montaje, y

barniz de uñas como sellador. La señal fluorescente y positiva a la forma activa de la caspasa-3 fue visualizada bajo un microscopio de fluorescencia (Microscope BX60F5, Olympus Optical Co., LTD, Japón).

VI.2.9. qRT-PCR

De condrocitos aislados: Condrocitos sembrados a una confluencia de 1×10^6 / mL DMEM 10% SFB en placas de 6 pozos fueron tratados durante 24 h con Cit en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata, o con 100 nM de Vi. Las células se cosecharon y su ARN total fue aislado y retrotranscrito con el estuche comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen GmnH, Hilden, Alemania) y para transcripción reversa (Applied Biosystems, Warrington UK), respectivamente.

De articulación de tobillo completo: La articulación de tobillo se extrajo de los animales control o AIA tratados o no con PRL o Hal al término del experimento (día 21 post-ACF). Los tejidos fueron congelados y pulverizados en nitrógeno líquido usando mortero y pistilo. El ARN total fue aislado con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y retrotranscrito con un estuche comercial para transcripción reversa (Applied Biosystems, Warrington UK).

Los productos de la PCR fueron detectados y cuantificados con Maxima Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Auburn, AL) en un volumen final de 10 μ L conteniendo el templado y 0.5 μ M de cada una de las secuencias específicas indicadas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias específicas de oligos para la amplificación de genes proapoptóticos

Gen	Sentido	Antisentido
caspasa-3	5'-GAAAGCCGAAACTCTTCATCA-3'	5'-ATAGTAACCGGGTGCGGTAT-3'
Bax	5'-ACTGGACAACAACATGGTGC-3'	5'-ATCAGCTCGGGCACTTTAGT-3'
p53	5'-AGAGACCCAGCAACTACCAACA-3'	5'-CTCAGACTGACAGCCTCTGCAT-3'
Bcl-xS	5'-ATCAGAGCTTTGAACAGGACA -3'	5'-TCACTTCCGACTGAAGAGTG-3'
Ubq	5'-CTGACAGGGTGCGGCCATCTT-3'	5'-ACTGCAGCCAACACCGCTGAC-3'

La amplificación fue realizada con el sistema de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad). Incluyó un punto de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación (10 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de alineación requerida por cada secuencia, y 30 seg a 72°C). Los datos de PCR fueron analizados mediante el método 2'

$\Delta\Delta CT$, y los CTs normalizados al gen de Ubiquitina (Ubq) fueron usados para calcular los niveles de expresión del ARNm de los genes de interés.

VI.3.0. Ensayo del corte de PRL exógena por condrocitos en cultivo

Condrocitos sembrados a una confluencia de 1×10^6 / mL DMEM 10% SFB en placas de 12 pozos fueron incubados durante 24 h sin o con 5 μ g de PRL recombinante humana en ausencia o presencia de Cit. Posteriormente los medios condicionados fueron levantados, centrifugados a 3.6×1000 rpm durante 10 min para descartar células, y congelados a -20° C hasta su análisis por Western blot. La presencia de PRL y Vi en 10 μ L de cada uno de los medios condicionados fue evaluada mediante SDS-PAGE, y en membranas de nitrocelulosa. Estas últimas se bloquearon con PBS – 0.5%Tween-20 – 1% leche durante 1 h, e incubaron durante una noche a 4° C con el anticuerpo anti-PRL humana CL-1 diluido 1:500. Finalmente, la proteína de interés fue revelada con el anticuerpo secundario conjugado al enzima fosfatasa alcalina, y el estuche comercial que contiene el sustrato para dicha enzima (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

VI.3.1. Inyección intra-articular de Cit en la rodilla del ratón *rprt^{-/-}*

Grupos de 3-5 ratones 129Svj silvestres (*rprt^{+/+}*) o depletados del receptor de PRL (*rprt^{-/-}*) fueron anestesiados con ketamina–xilacina (100 μ L/100 gr de peso, vía i.p.) e inyectados en la cavidad de la articulación femoro-tibial con un volumen de 10 μ L de vehículo (agua libre de endotoxinas) o conteniendo Cit [IL-1 β (25 ng), TNF- α (60 ng), e IFN- γ (25 ng)]. 48 h después de la inyección, los animales fueron anestesiados con dióxido de carbono y decapitados para la obtención de sangre, y la posterior evaluación de Vi en suero.

VI.3.2. Inmunoprecipitación y Western blot de PRL y Vi séricas

300 μ L del suero obtenido de los ratones silvestres o *rprt^{-/-}* inyectados con vehículo o Cit fueron incubados en agitación con 2 μ L del anticuerpo anti-PRL de ratón (elaborado por A. F. NAPP, Torrance CA.) durante una noche a 4° C. Posteriormente se incubaron bajo las mismas condiciones con 35 μ L de proteína A sefarosa durante 2 h. Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla conteniendo el complejo proteína A, anticuerpo anti-PRL y el ligando (PRL o Vi)

se lavó con 800 μ L de cada una de las siguientes soluciones: Netgel, Netgel con 10% de SDS, y Tris – NP-40, en las cuales, la pastilla fue incubada durante 10 min con agitación y a 4° C. Al finalizar cada lavado las muestras fueron sometida a una centrifugación de 10 000 rpm. Las proteínas de interés unidas al complejo, fueron liberadas con calor y amortiguador de carga Laemmli, separadas en SDS-PAGE al 15%, y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para evidenciar a la PRL y a las Vi en la membrana se utilizó el anticuerpo primario anti-PRL de ratón (NAPP), detectado con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa, y se revelaron con el estuche comercial que contiene el sustrato para la fosfatasa alcalina.

VI.3.3. Análisis estadístico

Los datos de los experimentos *in vitro* corresponden a réplicas de al menos tres experimentos independientes, y los datos de los experimentos *in vivo* provienen de la evaluación de grupos de 3-16 animales. El análisis estadístico fue realizado con el software Sigma Stat 7.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA) y GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). La distribución e igualdad de varianza de los datos se determinó con las pruebas D'Agostino-Pearson omnibus y Levene. Para datos con distribución normal y/o con varianzas iguales, las diferencias estadísticas entre dos y más de tres grupos se determinaron por la prueba T de Student, y análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de comparación post-hoc de Bonferroni, respectivamente. Para datos con distribución no-paramétrica, las diferencias estadísticas entre dos y más de tres grupo se determinaron con las pruebas U de Mann Whitney, y Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparación post-hoc de Dunn's, respectivamente. El nivel de significancia fue establecido a partir de una $P \leq 0.05$.

VI.3.4. Aprobación ética del estudio

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se ajustaron a los lineamientos de la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de Estados Unidos (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, D.C.).

VII. RESULTADOS

VII.1. La PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit

Para evaluar la acción condroprotectora de la PRL contra el tratamiento con Cit se utilizaron cultivos primarios de condrocitos articulares de rata, y la apoptosis se determinó mediante la valoración de los fragmentos nucleosomales del ADN por ELISA. A las 24 h del tratamiento con Cit, la apoptosis de los condrocitos aumentó dos veces respecto al nivel basal observado en células no tratadas, y el efecto proapoptótico de las Cit fue bloqueado por la co-administración de PRL en forma dependiente de su dosis (**Fig. 7**).

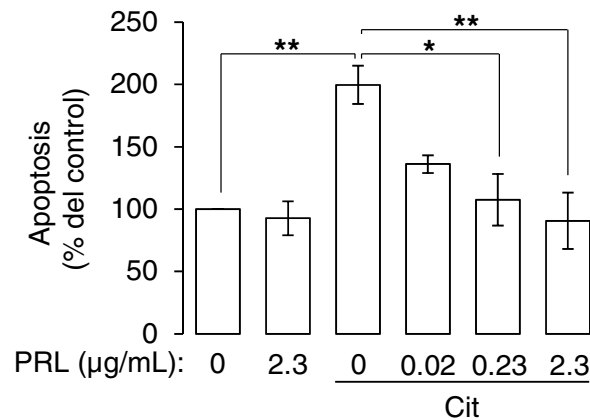


Figura 7. La PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit y su efecto es dosis-dependiente. Cultivos primarios de condrocitos se incubados durante 24 h sin o con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de dosis crecientes de PRL (μ g/mL) de rata, y la apoptosis fue valorada por ELISA mediante la detección de los fragmentos nucleosomales. La gráfica corresponde a las medias \pm s.e.m de tres experimentos independientes con tres réplicas. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01.

El efecto antiapoptótico de la PRL fue confirmado tras determinar la activación de la caspasa-3 por Western blot. El tratamiento con Cit incrementó el procesamiento de la procaspasa-3 hacia su forma activa con respecto al grupo control (sin tratamiento) (**Fig. 8A**), y el co-tratamiento con PRL abatió significativamente dicho efecto (**Fig. 8A-B**). La **figura 8B** muestra gráficamente los valores densitométricos de la caspasa-3 activa normalizados con respecto a la procaspasa-3 en el mismo blot.

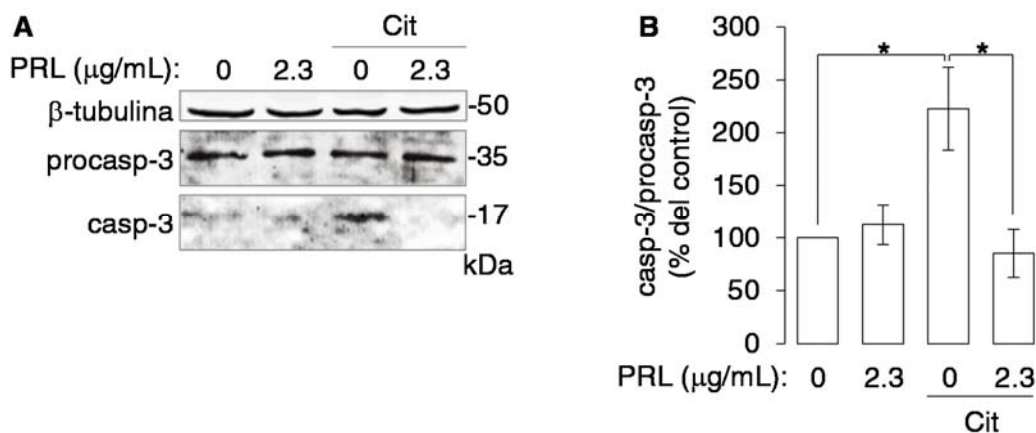


Figura 8. La PRL inhibe la activación de la caspasa-3 inducida por Cit. Cultivos primarios de condrocitos se incubaron durante 6 h sin o con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata. La activación de la caspasa-3 (casp-3) se valoró mediante Western blot (**A**) y se cuantificó mediante análisis densitométrico (**B**). La gráfica corresponde a las medias \pm s.e.m. de los valores de densitometría de la caspasa-3 activa normalizados con respecto a la procaspasa-3 (procasp-3), obtenidos de tres blots independientes. *P \leq 0.05.

En este trabajo también investigamos la expresión de la p53, una proteína implicada en la apoptosis de los condrocitos inducida por citocinas proinflamatorias (Csaki et al., 2008) y que se incrementa además en el cartílago artrítico (Hashimoto et al., 1998). El tratamiento de los condrocitos con Cit indujo el incremento de la expresión del ARNm de p53 15 veces sobre la expresión basal detectada en células control o tratadas solo con PRL; no obstante, el efecto de las Cit sobre p53 fue abatido significativamente cuando se administraron en conjunto con PRL (**Fig. 9**).

En línea con la evaluación del papel condroprotector de la PRL frente a Cit, evaluamos el cociente de las proteínas Bax/Bcl-2 cuyos efectos proapoptóticos/antiapoptóticos son conocidos. El tratamiento con Cit incrementó a la proteína Bax en condrocitos y dicho efecto fue abatido tras la co-administración de PRL. Más aún, la adición de la PRL por si sola o en conjunto con Cit indujo un aumento en la proteína antiapoptótica Bcl-2 (**Fig. 10A**), todo lo cual resultó en la disminución del cociente Bax/Bcl-2 como lo indica el análisis densitométrico de los blots (**Fig. 10B**).

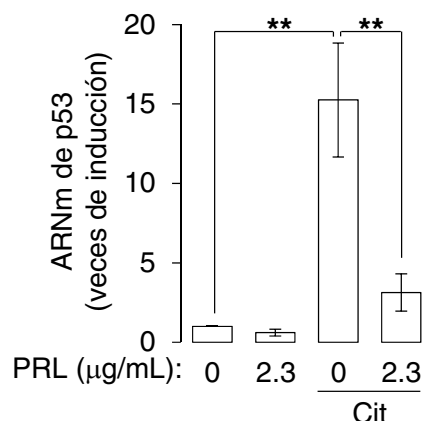


Figura 9. La PRL inhibe la expresión de la p53 inducida por Cit. Cultivos primarios de condrocitos se incubaron durante 24 h sin o con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata. La expresión de la p53 fue valorada mediante qRT-PCR. Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m de tres experimentos independientes. **P \leq 0.01.

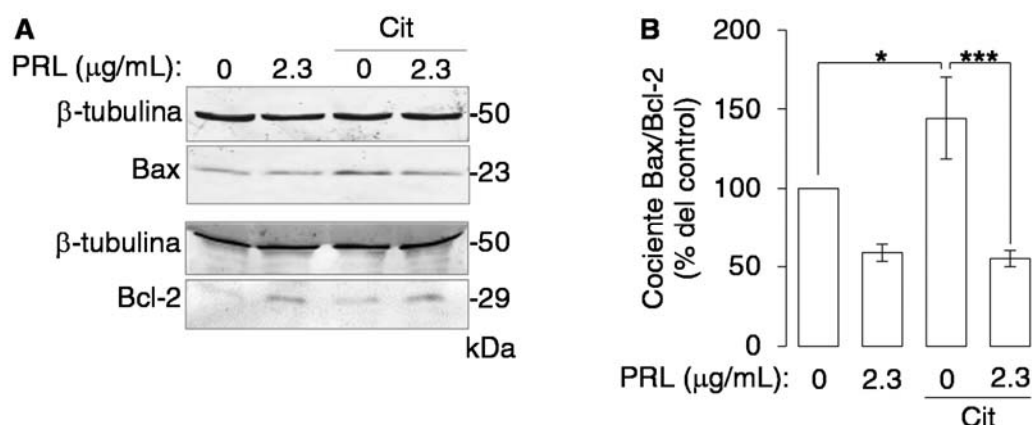


Figura 10. La PRL reduce el cociente de las proteínas Bax/Bcl-2 inducido por Cit. Cultivos primarios de condrocitos se incubaron durante 4 h sin o con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata. Las proteínas Bax y Bcl-2 se determinaron mediante Western blot (**A**) y se cuantificaron mediante análisis densitométrico (**B**). La gráfica corresponde a las medias de los valores de densitometría \pm s.e.m de tres blots independientes. *P \leq 0.05, ***P \leq 0.001.

VII.2. El efecto condroprotector de la PRL en contra de la apoptosis inducida por Cit no involucra la inhibición del NO

Debido a que el NO es uno de los principales mediadores de la acción proapoptótica de la IL-1 β , el TNF- α , y el IFN- γ sobre los condrocitos (Christodoulou and Choy, 2006; Goggs et al., 2003; Wu et al., 2007), evaluamos si la disminución de la producción del NO, y la inhibición de la iNOS, el enzima que lo produce en respuesta a Cit, ocurrían como mecanismos participantes en la acción condroprotectora de la PRL. Inicialmente los condrocitos se incubaron con Cit en ausencia o presencia de un inhibidor de las sintasas del óxido nítrico (NOS) conocido como L-NAME (Teixeira et al., 2001). El L-NAME previno la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit (**Fig. 11A**) con una potencia similar a la PRL. Sin embargo, el tratamiento con la hormona no tuvo un efecto aparente sobre los niveles de la proteína iNOS incrementados en respuesta a Cit como lo muestra el análisis por Western blot de extractos de condrocitos (**Fig. 11B**), ni de los metabolitos del NO [nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻)] evaluado mediante la reacción de Griess en los medios condicionados (**Fig. 11C**). Estos resultados sugieren que el efecto condroprotector de la PRL en contra de la apoptosis inducida por las Cit no involucra la inhibición del NO y que sus acciones pueden ser mediadas a través de una vía independiente.

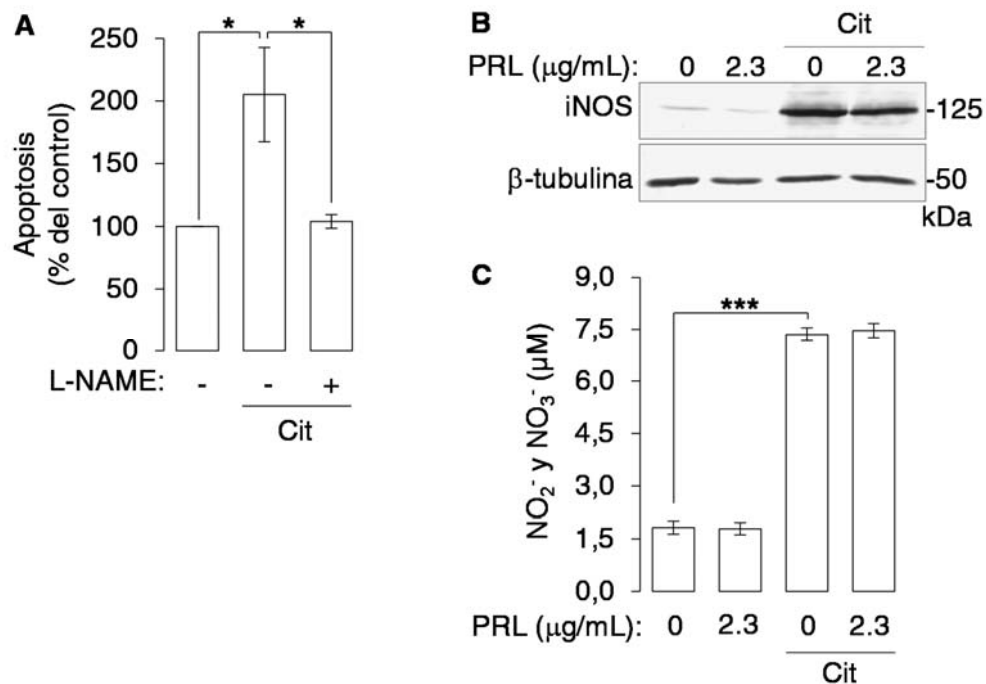


Figura 11. La PRL no modifica los niveles de la proteína iNOS ni del NO incrementados por Cit en condrocitos. (A) Determinación por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de 1 mM del inhibidor de la producción de NO L-NAME (un experimento con n = 3-6). (B) Análisis por Western blot de la proteína iNOS (n = 3 blots independientes) y (C) de la concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ (un experimento con n = 7) después de incubar a los condrocitos con Cit en ausencia o en presencia de 2.3 μ g/mL de PRL de rata durante 6 o 24 h, respectivamente. Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m. *P \leq 0.05, ***P \leq 0.001.

VII.3. El efecto condroprotector de la PRL en contra de la apoptosis inducida por Cit involucra la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3

La vía de señales JAK2/STAT3 se activa canónicamente por la PRL (DaSilva et al., 1996), y la activación de la STAT3 estimula la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y promueve la supervivencia de los condrocitos de la placa de crecimiento (Suemoto et al., 2007). En este sentido, evaluamos la capacidad de la PRL para activar al sistema de señales JAK2/STAT3 en condrocitos, siendo este uno de los posibles mecanismos por los cuales la hormona promovería la supervivencia del cartílago y mitigaría la acción proapoptótica de las Cit.

El tratamiento con PRL sola o en combinación con Cit estimuló la fosforilación/activación de la JAK2 como lo muestra el análisis por Western blot (**Fig. 12A**), e indujo la activación de la STAT3 evidenciada por la translocación de la misma al núcleo de los condrocitos (**Fig. 12B**). En condrocitos control o tratados con Cit, la señal de inmunoreactividad a STAT3 [tinción en rojo] se mantuvo circunscrita al citoplasma mientras que en los condrocitos tratados con PRL la señal se localizó predominantemente en el núcleo (**Fig. 12B**).

Para evaluar la relevancia de la participación del sistema de señales JAK2/STAT3 en la supervivencia condrocitaria, cultivos primarios de condrocitos fueron incubados con el inhibidor de la activación de la STAT3 conocido como S31-201 (Siddiquee et al., 2007). El tratamiento con 100 nM de S31-201 indujo la muerte por apoptosis de los condrocitos (**Fig. 13**) poniendo en evidencia la participación de la STAT3 en la promoción de la supervivencia de este tipo celular. El resultado sugiere que de ser inducida la activación

de la STAT3 por el tratamiento con PRL, la molécula activa podría constituir una señal mediadora de la inhibición del efecto proapoptótico de las Cit.

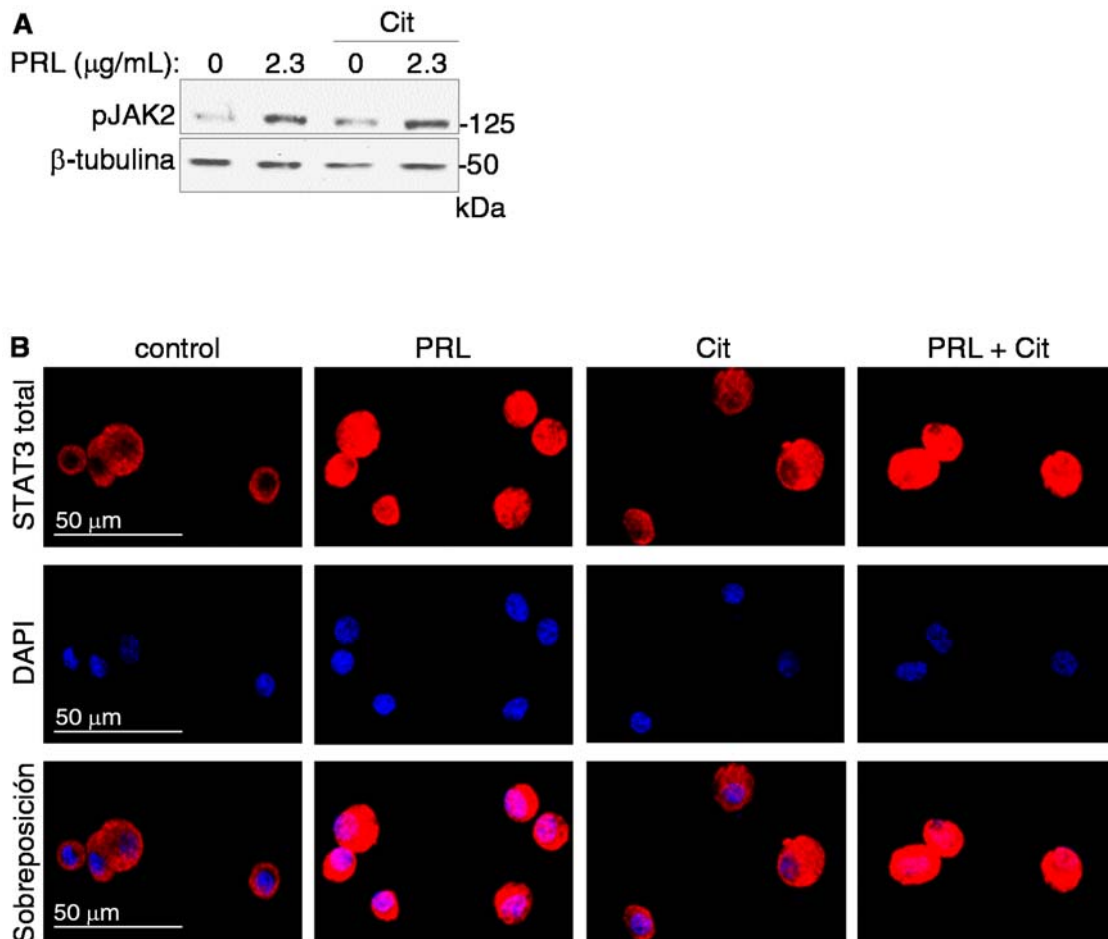


Figura 12. La PRL fosforila/activa a la JAK2 e induce la translocación de la STAT3 al núcleo de los condrocitos. (A) Western blot representativo de la proteína JAK2 fosforilada (pJAK2) en extractos de condrocitos incubados durante 30 min sin o con Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)] en ausencia o presencia de 2.3 $\mu\text{g/mL}$ de PRL de rata ($n = 3$ blots independientes). (B) Fotomicrografías representativas de condrocitos inmunomarcados contra el STAT3 total y contrateñidos con DAPI, después de incubarse durante 1 h sin tratamiento (control), o con PRL de rata (2.3 $\mu\text{g/mL}$), Cit, o PRL más Cit (PRL + Cit).

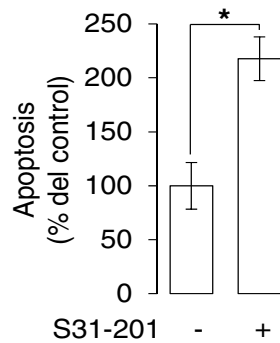


Figura 13. La inhibición de la activación de la STAT3 induce la apoptosis de los condrocitos.

Determinación por ELISA de la apoptosis de condrocitos incubados durante 24 h en ausencia o presencia de 100 nM del inhibidor de STAT3 S31-201. Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m de un experimento con $n = 3-4$. * $P \leq 0.05$.

VII.4. Desarrollo de la artritis inducida por adyuvante (AIA) en la rata

Dado que en las artropatías inflamatorias la apoptosis de los condrocitos se incrementa y contribuye a la degradación del cartílago articular (Hashimoto et al., 1998; Kim and Song, 1999; Kouri et al., 2000), la inhibición de su muerte por apoptosis podría constituir una estrategia terapéutica potencial para contrarrestar la destrucción del tejido en dichos padecimientos. A sabiendas de que la PRL protege contra la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit, y que las Cit activan la destrucción del cartílago dependiente de apoptosis en la artritis inflamatoria (Kim and Song, 1999; Lotz, 2001; McInnes and Schett, 2007; Polzer et al., 2007; Schuerwegh et al., 2003; Yatsugi et al., 2000), se investigó la capacidad de la PRL para contrarrestar la apoptosis de los condrocitos en el modelo de artritis inducida por adyuvante (AIA) en la rata. El modelo de AIA se utiliza frecuentemente para evaluar la efectividad de drogas antireumáticas y para describir alteraciones generales a nivel histológico, celular, y molecular de la artritis inflamatoria. Dicho modelo consta de la inyección intradérmica del adyuvante completo de Freund (ACF), una suspensión de aceite con partículas de micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis*) muertas por calor, que al liberar antígenos lentamente, induce una respuesta inmune prolongada que desencadena el desarrollo de artritis inflamatoria.

Para determinar el efecto condroprotector de la PRL en la AIA, inicialmente se estandarizó el modelo mediante la inmunización de ratas Sprague-Dawley machos con ACF (día 0), y se monitoreó el progreso de la artritis durante 21 días a partir de la inyección mediante la valoración de la circunferencia (hinchazón) del tobillo (**Fig. 14**).

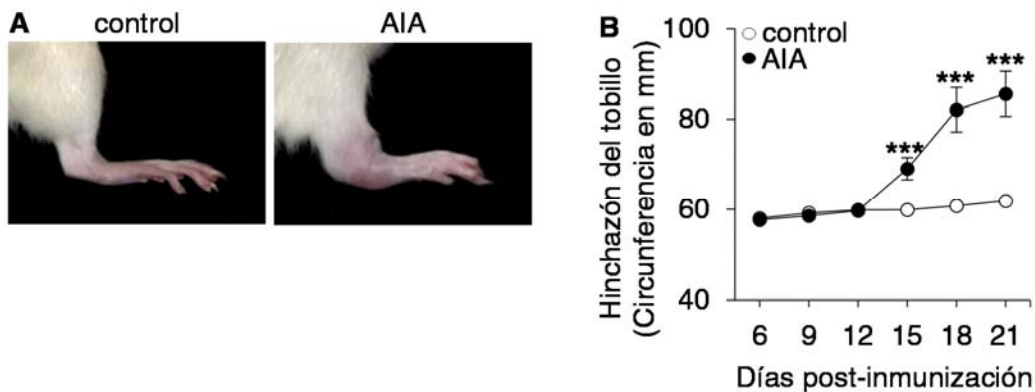


Figura 14. Desarrollo temporal de la AIA en la rata. (A) Fotografías representativas del tobillo de una rata control o con AIA (capturada al día 21 post-ACF). (B) Medidas de la circunferencia de los tobillos de ratas control o con AIA, registradas a los días 6, 9, 12, 15, 18 y 21 post-ACF. Los valores en la gráfica corresponden a las medias de la circunferencia en mm ± s.e.m. ***P≤0.001. n = 16.

Una vez establecido el modelo de AIA, se evaluó el efecto condroprotector de la PRL bajo un protocolo preventivo en el que se incrementaron los niveles circulantes de la hormona (hiperprolactinemia) antes de la inducción de la AIA, y bajo un protocolo curativo en el que la PRL circulante fue incrementada (al día 15 post-ACF) después de la inducción y establecimiento de la AIA.

VII.5. La hiperprolactinemia previene la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA

Para determinar si la PRL tenía la capacidad de “prevenir” la apoptosis de los condrocitos articulares inducida por la AIA, tres días previos a la inducción del padecimiento (inmunización con ACF) se implantaron minibombas osmóticas para liberar PRL o tabletas para liberar haloperidol (Hal). El Hal es un fármaco de uso clínico que aumenta los niveles circulantes de PRL a través de antagonizar a los receptores tipo D2

de la dopamina (Carboni et al., 2011; Hummer and Huber, 2004; Kapur et al., 2000) (**Fig. 15A**).

A Protocolo experimental preventivo

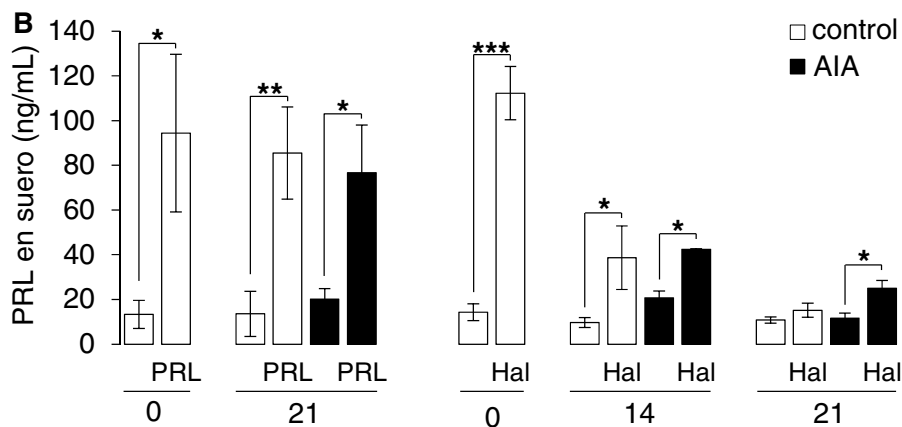
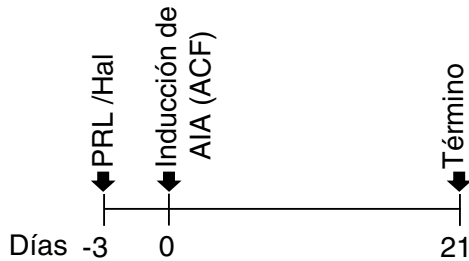
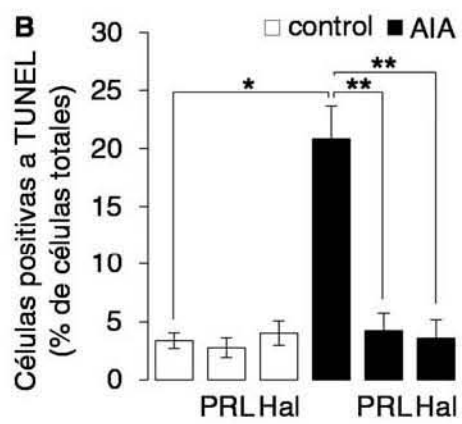
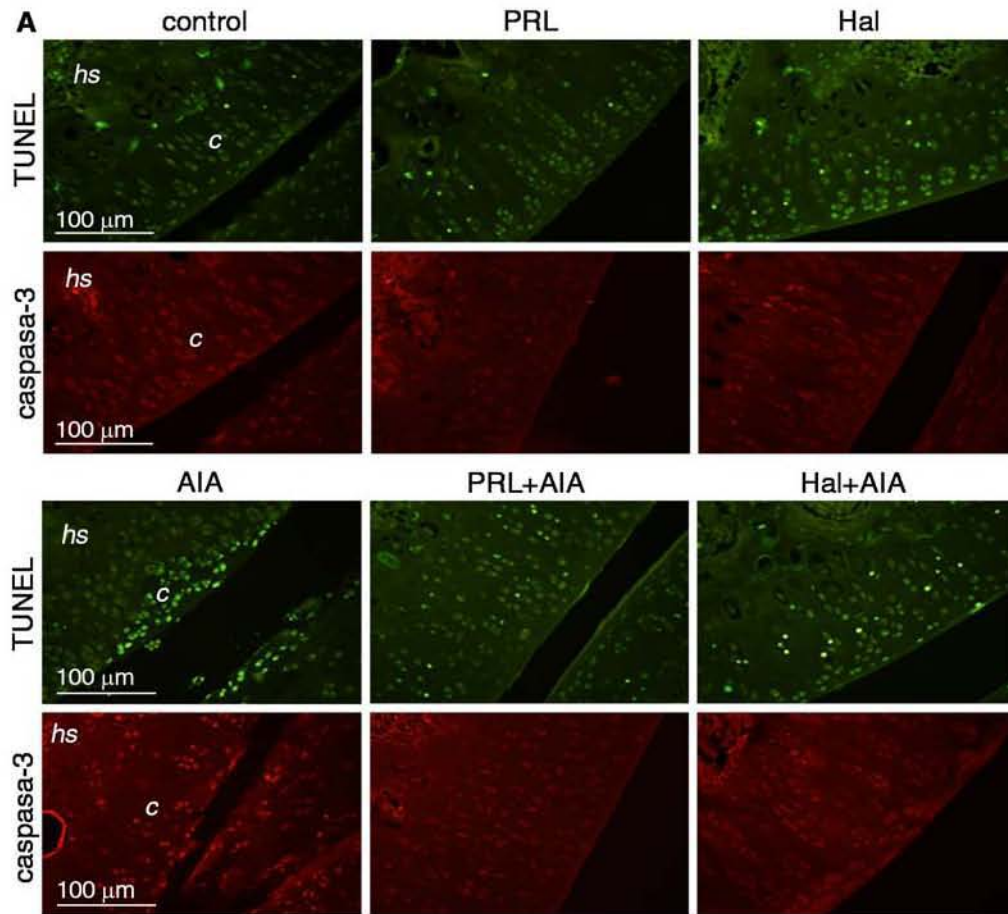


Figura 15. Hiperprolactinemia inducida con minibombas de infusión de PRL o por el tratamiento con Hal. (A) Diagrama del diseño experimental que indica la implantación subcutánea de minibombas osmóticas para infusión de PRL (PRL) o de tabletas de haloperidol (Hal) 3 días previos de la inducción de AIA. (B) Niveles de PRL en suero (ng/mL) valorados al día 0 y 21 post-ACF en ratas tratadas con PRL (n = 3-8), y a los días 0, 14, y 21 post-ACF en ratas tratadas con Hal (n = 4-8). Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Al día de la inmunización con ACF (día 0) los niveles circulantes de la PRL mostraron un incremento entre 7 y 8 veces sobre el nivel control tanto en el grupo infundido con PRL como en el tratado con Hal (**Fig. 15B**). El incremento de la PRL circulante (hiperprolactinemia) inducido por la infusión de PRL fue sostenido, mientras que el inducido por Hal fue transitorio, a juzgar por los niveles observados en el día 21 post-

inmunización con ACF que correspondieron a 6 y 2 veces, respectivamente, de los niveles de la PRL circulante en los animales control (**Fig. 13B**).



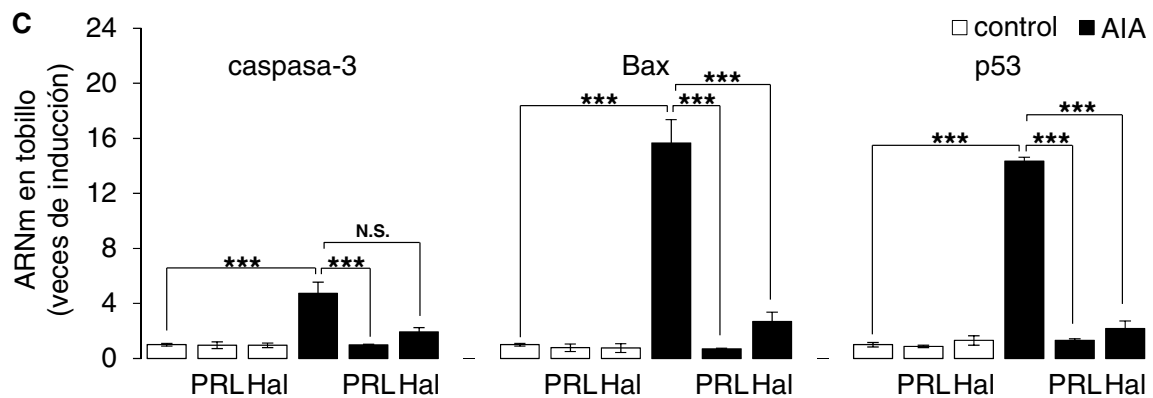


Figura 16. La PRL y el Hal previenen la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA. (A)

Secciones representativas de la articulación de rodilla de ratas control y tratadas con PRL o Hal, e inmunizadas o no con ACF. El cartílago se evaluó mediante TUNEL y la inmunotinción contra la caspasa-3 activa al día 21 post-ACF. **(B)** Cuantificación de las células positivas a TUNEL en el cartílago articular (n = 4-8). **(C)** Expresión del ARNm de la caspasa-3, Bax, y p53 en la articulación del tobillo de ratas control y tratadas con PRL o Hal, e inmunizadas o no con ACF. La cuantificación mediante qRT-PCR se realizó al día 21 post-ACF (n = 5-14). Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, N.S.: no significativo. *hs*; hueso sucondral, *c*; cartílago articular.

La destrucción del cartílago articular es una característica de la AIA (Cai et al., 2006) y en forma consistente con dichos reportes, en el presente trabajo se detectó un incremento en la apoptosis de los condrocitos del cartílago de los animales inmunizados con ACF mediante TUNEL e inmunotinción para la caspasa-3 activa. La evaluación se realizó al día 21 post-inmunización (**Fig. 16A**), correspondiente al pico máximo del padecimiento y fin del experimento (**Fig. 14B**). Asimismo, el tratamiento con ACF indujo el incremento en la expresión del ARNm de los factores proapoptóticos caspasa-3, Bax, y p53 evaluados en muestras de tejido de tobillo completo (**Fig. 16C**). La hiperprolactinemia inducida por la infusión de PRL o el tratamiento con Hal disminuyó la expresión de dichos factores (**Fig. 16C**) e inhibió la apoptosis de los condrocitos inducida por AIA como lo indica la disminución del número de células positivas a la tinción de TUNEL y a la caspasa-3 activa (**Fig. 16A-B**).

VII.6. La hiperprolactinemia mitiga la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA establecida

Para determinar el papel potencial de la PRL como agente “terapéutico”, se investigó si la hormona tenía la capacidad de mitigar la apoptosis de los condrocitos articulares en la artritis inflamatoria establecida (modelo curativo). Para ello se implantaron minibombas osmóticas de liberación de PRL al día 15 post-ACF (**Fig. 17A**), momento en el que la inflamación articular es evidente (**Fig. 14B**). La evaluación de los niveles de la PRL circulante al día 21 post-ACF mostró un incremento de hasta 5 veces en los animales infundidos con PRL tanto en el grupo control como en los animales con AIA (**Fig. 17B**). La hiperprolactinemia mitigó la apoptosis condrocitaria en el cartílago articular de las ratas con AIA (**Fig. 18A-B**), demostrado por la disminución de células positivas a TUNEL y a la inmunotinción para la caspasa-3 activa, además de la reducción en la expresión de los mediadores proapoptóticos caspasa-3, Bax, y p53 (**Fig. 18C**).

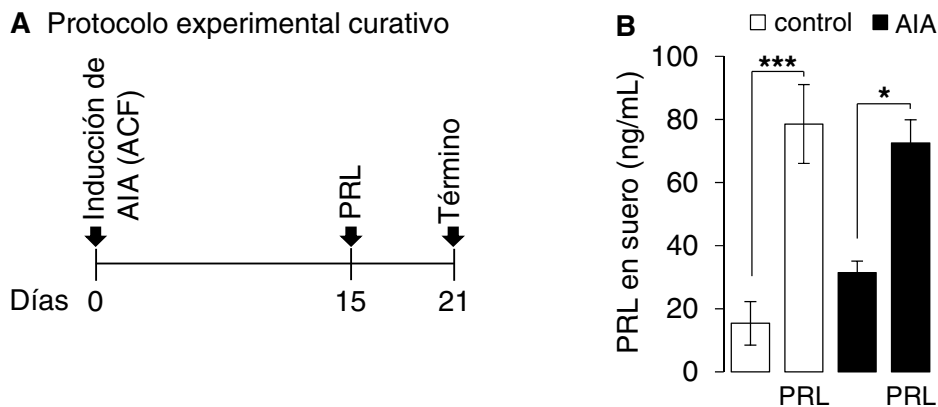


Figura 17. Hiperprolactinemia inducida con minibombas de infusión de PRL. (A) Diagrama del diseño experimental que indica la implantación subcutánea de minibombas osmóticas para infusión de PRL (PRL) 15 días posteriores a la inducción de AIA. El experimento concluyó el día 21 post-ACF. (B) Niveles de la PRL en el suero (ng/mL) de ratas control (no tratadas) o tratadas con PRL, valorados al día 21 post-ACF. Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$. n = 4-8.

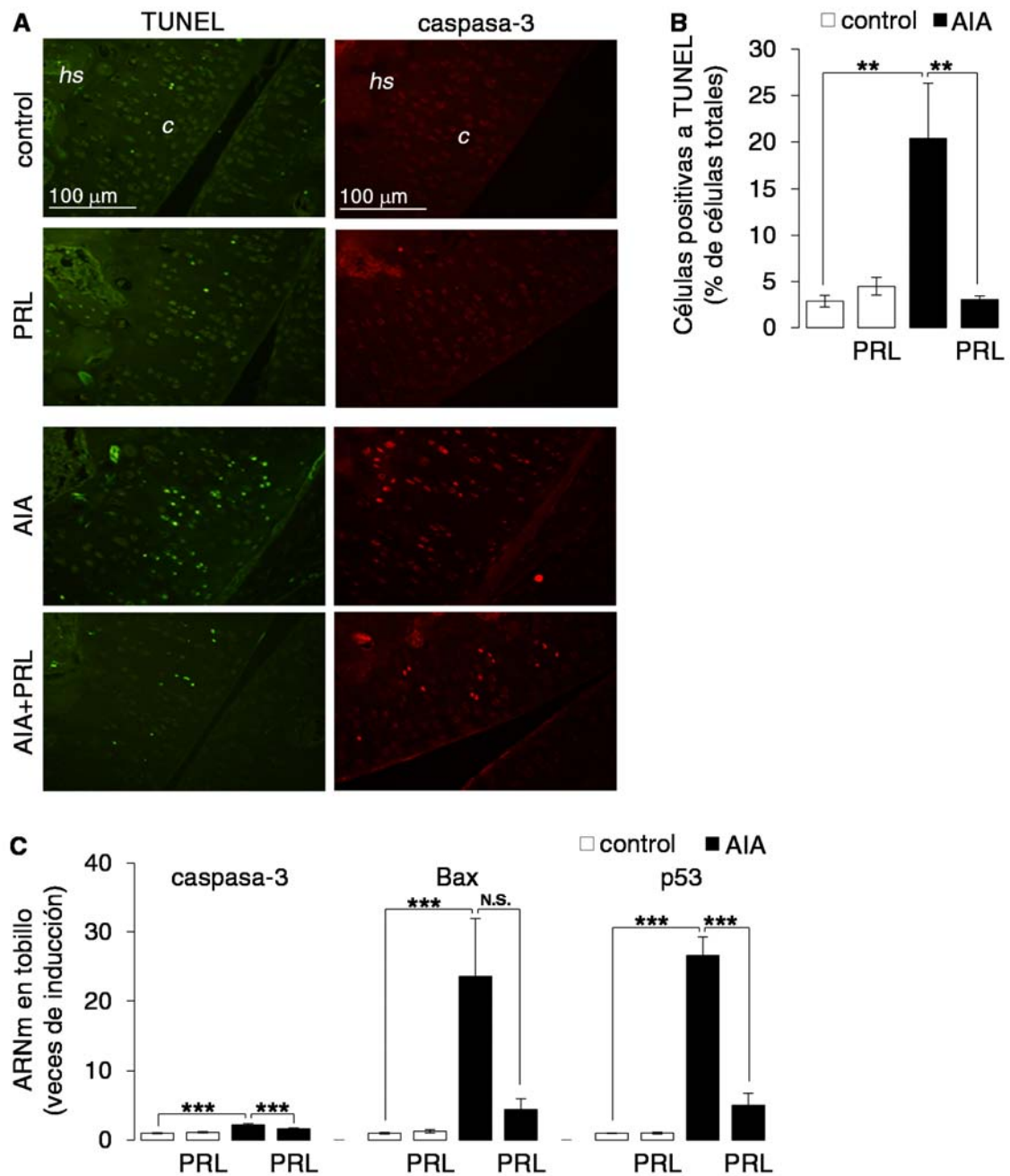


Figura 18. La PRL mitiga la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA establecida. (A)

Secciones representativas de la articulación de rodilla de ratas control o tratadas con PRL, e inmunizadas o no con ACF. El cartílago se evaluó mediante TUNEL y la inmunotinción contra la caspasa-3 activa al día 21 post-ACF. **(B)** Cuantificación de las células positivas a TUNEL en el cartílago articular (n = 4-8). **(C)** Expresión del ARNm de la caspasa-3, Bax, y p53 en la articulación del tobillo de ratas control o tratadas con PRL, e inmunizadas o no con ACF. La cuantificación

mediante qRT-PCR se realizó al día 21 post-ACF (n = 3-8). Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, N.S.: no significativo. *hs*; hueso subcondral, *c*; cartílago articular.

Los resultados hasta aquí mostrados ponen de manifiesto el efecto protector de la PRL sobre los condrocitos articulares, *in vitro* tras contrarrestar el efecto de tres citocinas proinflamatorias con alto impacto en la muerte condrocitaria, e *in vivo* al desplegar acciones preventivas y terapéuticas (curativas) contra la apoptosis del cartílago en la AIA. Si bien los resultados del presente trabajo evidencian el papel condroprotector de la PRL bajo condiciones de inflamación, cabe señalar que en razón de que dicha hormona se incrementa frecuentemente en la circulación de pacientes con AR, investigaciones previas asociaron a la PRL con la patofisiología de la artritis inflamatoria e intentaron correlacionar los niveles de la PRL circulante y la gravedad del padecimiento, sin embargo, los estudios son contradictorios. En un estudio reciente se analizaron 307 pacientes con AR, de los cuales, cuatro presentaron hiperpolactinemia y un índice de severidad del padecimiento menor que el resto del grupo (Haga et al., 2014). Por otro lado, un estudio realizado por Fojtikova y col., (2010) detectó una correlación moderada entre el nivel de la PRL en el líquido sinovial y la actividad de la AR (Fojtikova et al., 2010). En relación a esto, cabe considerar que en un microambiente inflamatorio podría favorecerse el procesamiento proteolítico de la PRL hacia sus derivados peptídicos las Vi, capaces de inducir la apoptosis de los condrocitos. En consecuencia, los efectos finales no serían la promoción de la supervivencia sino la inducción de la muerte condrocitaria. En línea con esto fue de interés para el presente trabajo evaluar si se favorece la generación de Vi bajo las condiciones de inflamación inducidas por el tratamiento con Cit *in vitro* e *in vivo*, y re-evaluar su efecto proapoptótico sobre los condrocitos para dilucidar algunos de los mecanismos de acción implicados en dicho proceso.

VII.7. El tratamiento con Cit favorece la proteólisis de PRL por condrocitos en cultivo

A sabiendas de que el cartílago es fuente de proteasas capaces de procesar eficientemente a la PRL (Macotela et al., 2006) y que dichas proteasas se incrementan

en respuesta a Cit, cultivos primarios de condrocitos se incubaron durante 24 h sin o con 5 μg de PRL humana en ausencia o presencia de Cit. Transcurrido el tiempo de tratamiento se colectaron los medios condicionados (MC), y la presencia de Vi producidas a partir de la proteólisis de la PRL exógena se evaluó mediante Western blot. Los condrocitos en cultivo procesaron a la PRL hacia Vi (**Fig. 19**). Los MC de condrocitos incubados con PRL sola o en combinación con Cit, a juzgar por su análisis es el blot, contienen a la PRL nativa (23 kDa) y fragmentos que resultan de su proteólisis (Vi de 14 y 18 kDa). El tratamiento con Cit incrementó la generación de Vi con base en la intensidad de las bandas de Vi en el mismo blot (**Fig. 19**).

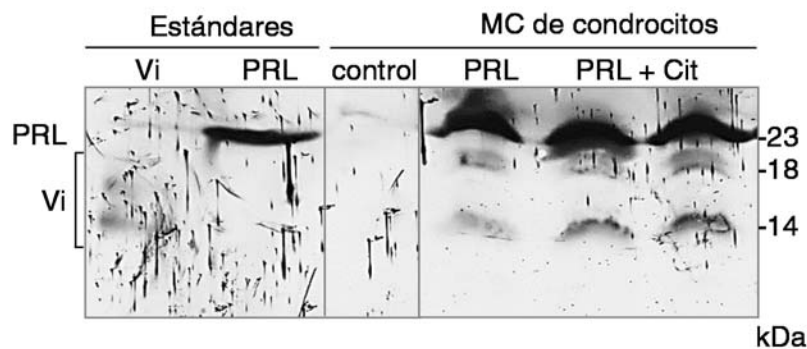


Figura 19. Las Cit favorecen la proteólisis de PRL por condrocitos en cultivo. Análisis por Western Blot de 10 μL de medio condicionado por condrocitos incubados durante 24 h sin o con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PRL recombinante humana en ausencia o presencia de Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)]. MC; medios condicionados. Blot representativo de dos experimentos independientes con dos réplicas.

VII.8. La inyección intra-articular de Cit favorece la proteólisis de PRL hacia Vi en el ratón *rprl*^{-/-}

Dado que uno de los fenotipos del ratón *rprl*^{-/-} es la hiperprolactinemia (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Bole-Feysot et al., 1998) a consecuencia de la falta de los efectos inhibitorios que ejerce la hormona sobre su propia secreción, se utilizaron ratones *rprl*^{+/+} y *rprl*^{-/-} como herramienta para el ensayo del procesamiento de la PRL *in vivo*, bajo la consideración de que partiendo de una mayor concentración de PRL en sangre, se podría detectar más fácilmente la generación de Vi en el suero de animales tras la administración de Cit.

Con dicho propósito los animales se inyectaron intra-articularmente con 10 μ L de vehículo (veh; agua libre de endotoxinas) o Cit [IL-1 β (25 ng), TNF- α (60 ng), e IFN- γ (25 ng)], y se sacrificaron 48 h post-inyección. Los sueros fueron colectados, inmunoprecipitados, y evaluados mediante Western blot. Los animales *rprl*^{-/-} presentaron una concentración de PRL (23 kDa) sérica mayor que los *rprl*^{+/+}, a juzgar por la intensidad de las bandas de PRL en el blot, inmuno-reactivas a un anticuerpo específico contra la PRL de ratón (**Fig. 20**). Interesantemente, la presencia de Vi se hizo evidente solo en los sueros inmunoprecipitados de animales hiperprolactinémicos (*rprl*^{-/-}) e inyectados intra-articularmente con Cit. Más aún, el hecho de que las Vi no se detectaran en el suero de los animales *rprl*^{-/-} inyectados con veh (**Fig. 20**) sugiere que las Cit son las responsables del procesamiento de la PRL.

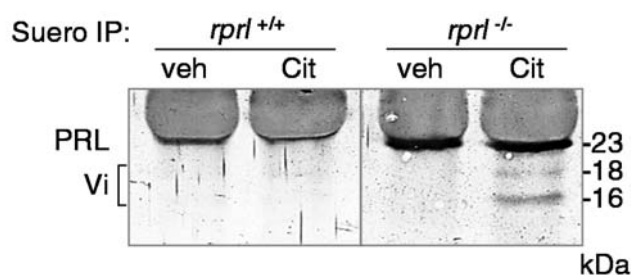


Figura 20. Proteólisis de PRL hacia Vi inducida por la inyección intra-articular de Cit. Análisis mediante Western blot de 300 μ L de suero inmunoprecipitados (IP), obtenidos de animales silvestres (*rprl*^{+/+}) o carentes del receptor de PRL (*rprl*^{-/-}), inyectados intra-articularmente con 10 μ L de vehículo (agua libre de endotoxinas) o Cit [IL-1 β (25 ng), TNF- α (60 ng), e IFN- γ (25 ng)]. Las bandas en el blot fueron inmuno-reactivas a un anticuerpo específico anti-PRL de ratón que reconoce tanto a la PRL nativa de 23 kDa como a las Vi. Suero IP; suero inmunoprecipitado, veh; vehículo.

VII.9. Las Vi inducen la apoptosis de los condrocitos

Para evaluar la acción proapoptótica de las Vi se utilizaron cultivos primarios de condrocitos articulares de rata, y la apoptosis se determinó mediante la valoración de los fragmentos nucleosomales del ADN por ELISA. A las 24 h del tratamiento con Vi, la apoptosis de los condrocitos aumentó dos veces respecto al nivel de apoptosis basal en células no tratadas (**Fig. 21A**) y su efecto fue comparable al nivel de apoptosis inducido

por Cit (**Fig. 1A**). De igual manera a como aconteció con Cit, la apoptosis de los condrocitos dependiente de Vi se acompañó del incremento del nivel de la proteína Bax, mientras que los niveles de la proteína Bcl-2 no se modificaron (**Fig. 21B**). También se evaluó mediante qRT-PCR la expresión de las proteínas proapoptóticas caspasa-3, Bcl-xS, Bax, y p53, reportadas como mediadores de la apoptosis inducida por Vi en otros tipos celulares (Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003). En condrocitos las Vi incrementaron la expresión de la caspasa-3, Bax y p53 (**Fig. 21C**).

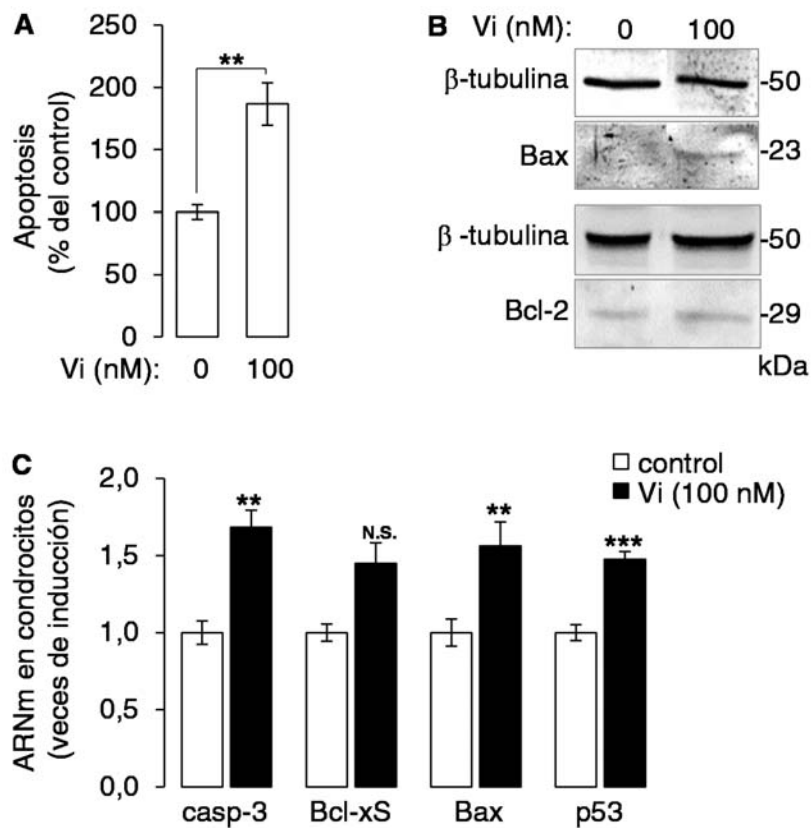


Figura 21. Las Vi inducen la apoptosis de los condrocitos. Cultivos primarios de condrocitos incubados durante 24 h sin o con Vi 100 nM. **(A)** Apoptosis de condrocitos valorada mediante la detección de fragmentos nucleosomales por ELISA (tres experimentos independientes con $n = 3$). **(B)** Blots representativos de las proteínas Bax y Bcl-2 detectadas en lisados celulares (experimento único). **(C)** Niveles de expresión de las proteínas proapoptóticas caspasa-3 (casp-3), Bcl-xS, Bax, y p53 valoradas mediante qRT-PCR (experimento único con $n = 3$). Los valores en las gráficas corresponden a las medias \pm s.e.m. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, N.S.; No significativo.

VII.10. El efecto proapoptótico de las Vi sobre los condrocitos no involucra la inducción de la vía iNOS/NO

Las Vi son capaces de inducir la expresión de la proteína iNOS y la producción NO en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2003), y el NO a su vez es un mediador de la apoptosis condrocitaria (**Fig. 11A**). A este respecto, se evaluaron los niveles de la proteína iNOS, y la concentración del NO en lisados celulares y medios condicionados, respectivamente, de condrocitos tratados o no con Vi, usando como control positivo el tratamiento con Cit. Las Cit indujeron el incremento de la proteína iNOS evaluada mediante Western blot (**Fig. 22A**) y la producción de NO evaluado mediante la reacción de Griess (**Fig. 22B**). No obstante, las Vi no tuvieron efecto sobre iNOS ni sobre NO (**Fig. 22A-B**). Estos resultados sugieren que la acción proapoptótica de las Vi en condrocitos involucra un mecanismo independiente a dicha vía.

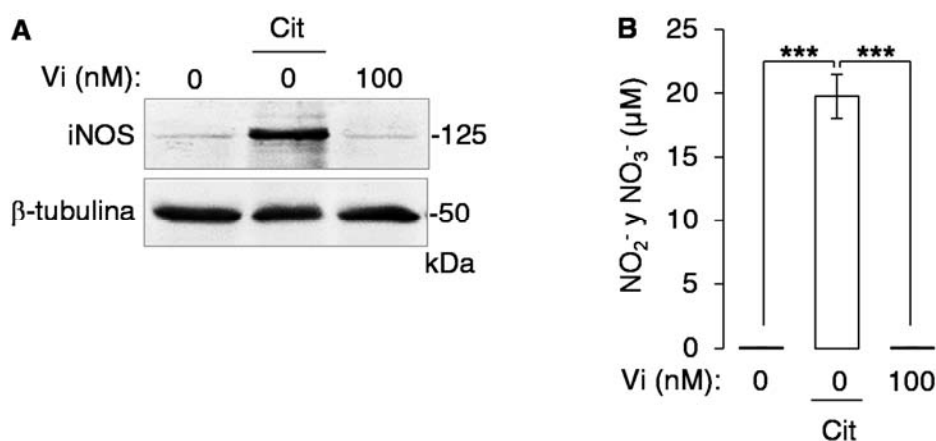


Figura 22. La apoptosis inducida por Vi no involucra el incremento de iNOS/NO. (A) Análisis por Western blot de la proteína iNOS en lisados de condrocito incubados durante 6 h en ausencia o presencia de 100 nM de Vi o Cit [IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (25 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL)]. (B) Cuantificación mediante Griess de la concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ en el medio condicionado de condrocito incubados durante 24 h en ausencia o presencia de 100 nM de Vi o Cit. Los valores graficados corresponden a las medias \pm s.e.m de dos experimentos independientes con n = 4 en A, y n = 3-16 en B. ***P \leq 0.001.

VIII. DISCUSIÓN

El cartílago articular es el tejido que recubre la superficie de los huesos en las articulaciones móviles y se especializa en absorber y amortiguar la presión generada por su uso. El cartílago está constituido por una única población de células denominadas condrocitos, embebidas en una matriz extracelular abundante que ellas mismas producen, y que determina las propiedades biomecánicas del cartílago. Cuando los condrocitos mueren por envejecimiento o la presencia de artropatías inflamatorias como la AR y la OR, el proceso de reparación y la tasa de recambio de la matriz disminuyen conduciendo hacia la destrucción del cartílago. La destrucción del cartílago es una característica en las artropatías inflamatorias y resulta de la acción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α , y el IFN- γ . La apoptosis de los condrocitos inducida por estos factores obedece principalmente a la activación de vías de muerte celular, y a la inducción de proteasas que degradan su matriz (Dayer, 2003; Schuerwegh et al., 2003). La apoptosis condrocitaria inducida por citocinas parece ser un evento primario y no una consecuencia de la degradación de la matriz, ya que en ratones transgénicos que sobre expresan al TNF- α la apoptosis de los condrocitos precede al desarrollo del cuadro completo de artritis (Polzer et al., 2007). Por todo lo anterior se ha propuesto que la inhibición de la muerte y/o la promoción de la supervivencia de los condrocitos podrían fungir como una estrategia eficaz para reducir la destrucción del cartílago, constituir una alternativa terapéutica para enfrentar a las artropatías. En este contexto, la hormona prolactina podría desempeñar un papel protector contra dichos padecimientos a través de inhibir la apoptosis condrocitaria.

La PRL es conocida principalmente por sus efectos lactogénicos en los mamíferos, pero regula un gran número de eventos fisiológicos que resultan de sus acciones sobre procesos como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Krishnan et al., 2003; Tessier et al., 2001; Zermeno et al., 2006). La PRL actúa como un agente antiapoptótico para distintos tipos celulares incluyendo células del epitelio mamario (Humphreys and Hennighausen, 1999), de la decidua uterina (Tessier et al., 2001), del tejido linfoide (Krishnan et al., 2003), y del cartílago articular (Zermeno et al., 2006). La PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos en cultivo inducida por la disminución del

suero (Zermeno et al., 2006) o por el tratamiento con Cit (Adán, 2010). Asimismo, actúa como un factor de supervivencia para los condrocitos bajo condiciones de inflamación aguda. Las Cit inyectadas intra-articularmente inducen la apoptosis de los condrocitos articulares con una potencia mayor en el ratón desprovisto del RPRL (*rprl*^{-/-}) comparado al ratón silvestre (*rprl*^{+/+}) (Adán, 2008; Adan et al., 2013), y el efecto proapoptótico de las mismas Cit en la articulación de la rata es abatido por un incremento en la concentración de la PRL circulante, o bien por la administración conjunta de una dosis farmacológica de la hormona (Guzmán-Morales, 2008). Dado que el RPRL está presente en el cartílago articular (Zermeno et al., 2006), la PRL podría inducir la activación de vías de supervivencia en los condrocitos articulares favoreciendo así la preservación del cartílago en las artropatías.

En relación a lo anterior, nos planteamos evaluar mediante experimentos *in vitro* a las señales implicadas en la condroprotección ejercida por la PRL, además de investigar *in vivo* si la acción antiapoptótica de la hormona protege al cartílago de la apoptosis inducida por la artritis inflamatoria, esto último a través de evaluar el efecto de la hiperprolactinemia sobre el cartílago de ratas con artritis inducida por adyuvante.

Los hallazgos de este trabajo demuestran que el efecto antiapoptótico de la PRL sobre los condrocitos tratados con Cit ocurre en forma dependiente de su dosis. La apoptosis inducida por Cit fue inhibida por PRL cuando esta se administró en un rango de concentraciones (0.2-2.3 µg/mL) mayor a la concentración presente en el líquido sinovial de pacientes con AR (0.007-0.02 µg/mL) (Ogueta et al., 2002; Rovensky et al., 2005), pero comparable a la detectada en la circulación (0.2-0.3 µg/mL) durante el embarazo y la lactancia (Ben-Jonathan et al., 2008). El efecto condroprotector de la PRL sobre condrocitos en cultivo tratados con Cit se acompañó de la inhibición de la expresión del ARNm de la p53 y del incremento en el cociente de Bax/Bcl-2, y de la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN. Las concentraciones de las Cit empleadas fueron similares (1-10 ng/mL) a las reportadas en el líquido sinovial de pacientes con AR activa (Schlaak et al., 1996; Westacott et al., 1990), y a las producidas por condrocitos activados (Rohner et al., 2012). Una vez evaluado y confirmado el efecto antiapoptótico de la PRL, evaluamos si su efecto condroprotector involucraba la inhibición de la vía de señales iNOS/NO inducida por Cit. El NO es uno de los principales mediadores de la apoptosis

condrocitaria dependiente de Cit, y la PRL tiene la capacidad de inhibir la producción del NO y la expresión de la iNOS inducida por las mismas en fibroblastos de pulmón. Con este antecedente, evaluamos si la inhibición de dicha vía podría constituir un mecanismo por el cual la PRL ejerce sus acciones condroprotectoras. En contra de lo esperado, la PRL no inhibió la expresión de la proteína iNOS ni la producción del NO inducidas por las Cit, sugiriendo la independencia de esta vía al efecto antiapoptótico de la hormona sobre los condrocitos, pero la implicación de otras posibles vías. A este respecto, evaluamos la participación de la vía JAK2/STAT3 activada por PRL como un mecanismo para mitigar el efecto proapoptótico de las Cit. Diversos reportes muestran que la activación de la JAK2 por PRL resulta en el reclutamiento, fosforilación y activación de los factores de transcripción STATs (DaSilva et al., 1996; Mangoura et al., 2000). Particularmente, la activación del factor de transcripción STAT3 ha sido descrita como una señal de supervivencia en múltiples tipos celulares, incluidos fibroblastos y líneas celulares de cáncer. Su acción antiapoptótica involucra la inducción de genes antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL, y Mcl-1, y la inhibición de genes proapoptóticos como Bax (Battle and Frank, 2002). Con relación a la supervivencia condrocitaria, la activación de la STAT3 inhibe la apoptosis de los condrocitos de la placa de crecimiento a través de inducir la expresión de Bcl-2 (Suemoto et al., 2007), y nuestros hallazgos muestran que la inhibición de la STAT3 resulta en la apoptosis de los condrocitos articulares, señalando su participación en la promoción de la supervivencia condrocitaria y sugiriendo su implicación como un mecanismo para mitigar el efecto proapoptótico de las Cit. Aun así, dada la activación de la JAK2 inducida por PRL en nuestros cultivos de condrocitos, no se descarta la posibilidad de que el efecto antiapoptótico de ésta involucre señales activadas por la JAK2 independientes de la STAT3. Ya que a través de la JAK2, la PRL también desencadena la activación de la vía PI3K/Akt (al-Sakkaf et al., 1997; Bailey et al., 2004; Hunter et al., 1997; Tessier et al., 2001), y la activación de la Akt ha sido involucrada con la inhibición de la apoptosis condrocitaria en la osteoartritis (Chen et al., 2012).

La capacidad de la PRL para activar mecanismos capaces de contrarrestar la acción proapoptótica de las Cit en los condrocitos plantea a la hormona como una herramienta promisoriosa para enfrentar a la artritis inflamatoria, y con esta idea, evaluamos su capacidad para promover la supervivencia de los condrocitos articulares en el modelo de

artritis inducida por adyuvante (AIA). La AIA ocurre como un cuadro de artritis inflamatoria acompañada de la destrucción del hueso subcondral y del cartílago (Bendele, 2001; Cai et al., 2006). Aquí evidenciamos que la AIA provocada por la inmunización con ACF resultó en el incremento de la expresión de marcadores proapoptóticos en la articulación, e indujo la muerte por apoptosis de un gran número de condrocitos articulares. En estas condiciones la inducción de hiperprolactinemia mediante la infusión de PRL exógena, o por el tratamiento con Hal (un antagonista de los receptores dopaminérgicos del subtipo D2, ampliamente utilizado en la clínica como antipsicótico y que resulta en el incremento en la secreción endógena de la PRL hipofisiaria al bloquear la acción inhibitoria de la dopamina hipotalámica sobre los lactotropos), antes o después de administrar el ACF, redujo el número de condrocitos en apoptosis y disminuyó significativamente la expresión de las proteínas proapoptóticas caspasa-3, Bax y p53 en los animales con AIA.

La idea de inducir hiperprolactinemia para controlar la progresión del daño articular en la artritis inflamatoria es novedosa, si bien la PRL ha sido relacionada con la patofisiología del cartílago debido a que en pacientes con AR los niveles de la hormona se incrementan frecuentemente tanto en la circulación (Mateo et al., 1998; Seriola et al., 2002) como en el líquido sinovial (Nagafuchi et al., 1999; Ogueta et al., 2002). Sin embargo el incremento en los niveles de la PRL se reporta solo en una proporción muy pequeña (6%) de los pacientes con AR (Orbach et al., 2007), y no existe una correlación clara entre la magnitud de la hiperprolactinemia y la severidad del padecimiento (Chuang and Molitch, 2007). A este respecto, el análisis de 307 pacientes con AR en un estudio reciente, mostró a cuatro de los pacientes con niveles de PRL sérica superiores a los basales (> 637 mIU/L para mujeres; > 456 mIU/L para hombre) y a su vez con menor actividad del padecimiento respecto al resto (Haga et al., 2014), mientras que en otro estudio se reportó una correlación moderada entre el nivel de la PRL en el líquido sinovial y la actividad de la AR (Fojtikova et al., 2010). En vista de todo esto, para establecer con mayor precisión el efecto real de la PRL en las artropatías inflamatorias se requiere de estudios que esclarezcan la relación entre los niveles locales y circulantes de la PRL y su regulación en el entorno proinflamatorio de estas condiciones.

En relación a lo anterior, resulta importante mencionar que los efectos finales de la PRL podrían estar supeditados a la tasa de proteólisis de su molécula. La PRL contiene la

capacidad potencial de prevenir o de inducir la apoptosis condrocitaria dependiendo de si es o no procesada hacia Vi, una familia de péptidos derivados de la hormona con acciones antiangiogénicas (Clapp et al., 2006), proinflamatorias (Corbacho et al., 2003), y proapoptóticas (Ferraris et al., 2011; Martini et al., 2000). Los condrocitos producen fisiológicamente proteasas (MMPs) capaces de procesar eficientemente a la PRL (Macotela et al., 2006) favoreciendo la presencia y disponibilidad de Vi en el cartílago. Dados los efectos antiangiogénicos de las Vi, su presencia y generación en el cartílago podría contribuir al mantenimiento de su condición avascular. Sin embargo, en la artritis inflamatoria, donde la producción y activación de proteasas se incrementa en respuesta a citocinas proinflamatorias (Breedveld, 2004; Goldring, 2000; Sandell and Aigner, 2001), podría favorecerse una mayor producción de Vi. Dada esta condición, las acciones de las Vi podrían sobrepasar sus posibles efectos fisiológicos desencadenando efectos adversos como la promoción de la apoptosis condrocitaria. En este contexto y dado que previo al presente trabajo no se había evaluado la generación de las Vi a partir de la PRL en condiciones de inflamación, y que los mecanismos de la acción proapoptótica de las Vi sobre los condrocitos no se habían explorado, nos planteamos investigar si la condición inflamatoria inducida por el tratamiento con Cit *in vitro* o *in vivo* favorecía la generación de Vi a partir de PRL, así como determinar a algunos de los mecanismos implicados en la acción proapoptótica de las Vi sobre los condrocitos en cultivo. Los resultados demuestran que las Cit favorecen el corte de la PRL hacia Vi en condrocitos en cultivo, y que la inyección intra-articular de Cit en el ratón *rprl*^{-/-} [que por falta de la retroalimentación negativa de PRL son hiperprolactinémicos] induce la generación de Vi detectables en el suero, sugiriendo que la inflamación puede inducir la muerte condrocitaria no solo a través de activar mecanismos de muerte celular y la degradación de la matriz, sino también a través de eliminar factores de supervivencia natural para el cartílago, como sería la PRL. No obstante, en razón de que la hiperprolactinemia contrarrestó la apoptosis en el cartílago inducido por la AIA, es muy probable que la resultante final de sus efectos en la supervivencia de los condrocitos esté supeditada a la concentración de PRL, a la tasa de producción PRL/Vi determinada por la presencia de proteasas en el microambiente celular, y a la competencia entre sus acciones. En este respecto, dado a que los resultados aquí mostrados indican que las Vi inducen la

apoptosis condrocitaria [en un mecanismo independiente de iNOS/NO] acompañada de la inducción de los factores proapoptóticos p53, Bax, y caspasa-3, así como de la fragmentación del ADN, y que la PRL tiene la capacidad potencial de inhibir la apoptosis condrocitaria inducida por Cit a través de contrarrestar a los mismos componentes, apoya la posibilidad de que bajo ciertas condiciones [alta hiperprolactinemia] la PRL sea capaz de contrarrestar las acciones proapoptóticas de sus derivados. Queda pendiente evaluar los niveles de vasoinhibinas en los animales sometidos a AIA y si la administración articular de estos péptidos promueve la destrucción del cartílago articular. Asimismo, estudios en curso están caracterizando la naturaleza de las proteasas de PRL activadas por citocinas en el cartílago articular y en otros tejidos de la articulación.

La acción dual PRL/Vi podría contribuir a esclarecer resultados controversiales asociados a la participación de la PRL en la patofisiología de la AR. Por ejemplo, se ha reportado que en la lactancia, un estado de hiperprolactinemia fisiológica, se incrementa la severidad de la AR (Barrett et al., 2000), pero que dicho estado reduce el riesgo de presentar AR en mujeres no artríticas (Karlson et al., 2004). Los resultados de esta tesis son consistentes con la posibilidad de que bajo condiciones de hiperprolactinemia [lactancia] se favorece la generación de Vi en presencia de un cuadro inflamatorio pero no en su ausencia. En este sentido, las Vi pudieran generarse y contribuir a la exacerbación de la AR en mujeres lactantes; sin embargo, en ausencia de artritis la PRL no sería procesada proteolíticamente hacia Vi favoreciendo la ocurrencia de las acciones protectoras de la hormona, las cuales a través de activar vías de supervivencia celular (JAK2/STAT3) podrían prevenir el desarrollo de la artritis.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo reportamos que el efecto condroprotector de la PRL frente al reto con Cit ocurre como una respuesta dependiente de su dosis, y que su acción antiapoptótica sobre los condrocitos no depende de la inhibición de la vía iNOS/NO inducida por Cit, pero que la fosforilación/activación de la vía JAK2/STAT3 por la PRL está implicada en la promoción de la supervivencia condrocitaria, y podría constituir un mecanismo para mitigar el efecto proapoptótico de las Cit. Nuestros hallazgos también ponen en evidencia que el incremento en los niveles circulantes de la PRL previene la muerte y protege a los condrocitos del cartílago contra la apoptosis inducida por la AIA, sugiriendo que procedimientos capaces de incrementar los niveles circulantes de la hormona podrían constituir terapias novedosas para contrarrestar la destrucción del cartílago dependiente de apoptosis en las artropatías inflamatorias. No obstante, dado que la condición inflamatoria propicia el ambiente para la proteólisis de la PRL hacia Vi, una familia de péptidos derivado de la hormona y con efectos proapoptóticos, evaluamos la generación de Vi a partir de PRL inducida por el tratamiento con Cit tanto *in vitro* como *in vivo*, evidenciando que las Cit favorecen el corte de la PRL hacia Vi en condrocitos en cultivo, y que la inyección intra-articular de Cit en el ratón *rprl*^{-/-} [hiperprolactinémico] promueve la generación de Vi, sugiriendo que la inflamación puede inducir la muerte condrocitaria no solo a través de activar mecanismos de muerte celular y degradación de la matriz, sino también a través de eliminar factores de supervivencia natural para el cartílago. No obstante, dado que la hiperprolactinemia contrarrestó la apoptosis en el cartílago inducido por la AIA, sugerimos que la resultante final de sus efectos en la supervivencia de los condrocitos podría estar supeditada a la concentración de PRL, a la relación PRL/Vi determinada por el microambiente celular, y a la competencia entre sus acciones.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adán, N. 2008. Análisis del efecto de la prolactina en la supervivencia del cartílago articular. *TESIS*. Licenciatura en Biología:34 pp.
- Adán, N. 2010. Estudio del efecto de la prolactina como agente antiapoptótico en condrocitos. *Tesis de maestría*. Maestría en Ciencias (Neurobiología):55 pp.
- Adan, N., J. Guzman-Morales, M.G. Ledesma-Colunga, S.I. Perales-Canales, A. Quintanar-Stephano, F. Lopez-Barrera, I. Mendez, B. Moreno-Carranza, J. Triebel, N. Binart, G. Martinez de la Escalera, S. Thebault, and C. Clapp. 2013. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 123:3902-3913.
- Adan, N., M.G. Ledesma-Colunga, A.L. Reyes-Lopez, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2014. Arthritis and prolactin: A phylogenetic viewpoint. *General and comparative endocrinology*. 203C:132-136.
- Aigner, T., and L. McKenna. 2002. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 59:5-18.
- al-Sakkaf, K.A., P.R. Dobson, and B.L. Brown. 1997. Prolactin induced tyrosine phosphorylation of p59fyn may mediate phosphatidylinositol 3-kinase activation in Nb2 cells. *J Mol Endocrinol*. 19:347-350.
- Aranda, J., J.C. Rivera, M.C. Jeziorski, J. Riesgo-Escovar, G. Nava, F. Lopez-Barrera, H. Quiroz-Mercado, P. Berger, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 46:2947-2953.
- Arden, N., and M.C. Nevitt. 2006. Osteoarthritis: epidemiology. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 20:3-25.
- Bachelot, A., and N. Binart. 2007. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*. 133:361-369.
- Bailey, J.P., K.M. Nieport, M.P. Herbst, S. Srivastava, R.A. Serra, and N.D. Horseman. 2004. Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway. *Mol Endocrinol*. 18:1171-1184.
- Baldocchi, R.A., L. Tan, D.S. King, and C.S. Nicoll. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*. 133:935-938.
- Barbalat, R., S.E. Ewald, M.L. Mouchess, and G.M. Barton. 2011. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annual review of immunology*. 29:185-214.
- Barrett, J.H., P. Brennan, M. Fiddler, and A. Silman. 2000. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 43:1010-1015.

- Bartok, B., and G.S. Firestein. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*. 233:233-255.
- Battle, T.E., and D.A. Frank. 2002. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*. 2:381-392.
- Ben-Jonathan, N., C.R. LaPensee, and E.W. LaPensee. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*. 29:1-41.
- Ben-Jonathan, N., J.L. Mershon, D.L. Allen, and R.W. Steinmetz. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews*. 17:639-669.
- Bendele, A. 2001. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 1:377-385.
- Berenbaum, F. 2000. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 67:561-564.
- Berenbaum, F. 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 21:16-21.
- Berumen-Nafarrate, E., I. Leal-Berumen, E. Luevano, F.J. Solis, and E. Munoz-Esteves. 2002. Synovial tissue and synovial fluid. *The journal of knee surgery*. 15:46-48.
- Billiau, A., and P. Matthys. 2009. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews*. 20:97-113.
- Boissier, M.C., G. Chiochia, N. Bessis, J. Hajnal, G. Garotta, F. Nicoletti, and C. Fournier. 1995. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *European journal of immunology*. 25:1184-1190.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, and P.A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*. 19:225-268.
- Boutin, J.M., C. Jolicoeur, H. Okamura, J. Gagnon, M. Edery, M. Shirota, D. Banville, I. Dusanter-Fourt, J. Djiane, and P.A. Kelly. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*. 53:69-77.
- Breedveld, F.C. 2004. Osteoarthritis--the impact of a serious disease. *Rheumatology*. 43 Suppl 1:i4-8.
- Buckwalter, J.A., and H.J. Mankin. 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*. 47:477-486.
- Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff. 2006. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 11:529-543.
- Butler, D.M., A.M. Malfait, L.J. Mason, P.J. Warden, G. Kollias, R.N. Maini, M. Feldmann, and F.M. Brennan. 1997. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene

- develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *Journal of immunology*. 159:2867-2876.
- Cai, X., Y.F. Wong, H. Zhou, Y. Xie, Z.Q. Liu, Z.H. Jiang, Z.X. Bian, H.X. Xu, and L. Liu. 2006. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 373:140-147.
- Carboni, L., M. Negri, F. Michielin, S. Bertani, S.D. Fratte, B. Oliosi, and P. Cavanni. 2011. Slow dissociation of partial agonists from the D2 receptor is linked to reduced prolactin release. *Int J Neuropsychopharmacol*:1-12.
- Clancy, R.M., P.F. Gomez, and S.B. Abramson. 2004. Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 12:552-558.
- Clapp, C., J. Aranda, C. Gonzalez, M.C. Jeziorski, and G. Martinez de la Escalera. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 17:301-307.
- Clapp, C., S. Thebault, E. Arnold, C. Garcia, J.C. Rivera, and G.M. de la Escalera. 2008a. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 295:E772-778.
- Clapp, C., S. Thebault, and G. Martinez de la Escalera. 2008b. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 13:55-67.
- Clapp, C., L. Torner, G. Gutierrez-Ospina, E. Alcantara, F.J. Lopez-Gomez, M. Nagano, P.A. Kelly, S. Mejia, M.A. Morales, and G. Martinez de la Escalera. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:10384-10388.
- Corbacho, A.M., Y. Macotela, G. Nava, J.P. Eiserich, C.E. Cross, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS letters*. 544:171-175.
- Corbacho, A.M., G. Martinez De La Escalera, and C. Clapp. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *The Journal of endocrinology*. 173:219-238.
- Corbacho, A.M., G. Nava, J.P. Eiserich, G. Noris, Y. Macotela, I. Struman, G. Martinez De La Escalera, B.A. Freeman, and C. Clapp. 2000. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of biological chemistry*. 275:13183-13186.
- Cruz-Soto, M.E., G. Cosio, M.C. Jeziorski, V. Vargas-Barroso, M.B. Aguilar, A. Carabez, P. Berger, P. Saftig, E. Arnold, S. Thebault, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2009. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipofyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology*. 150:5446-5454.

- Csaki, C., N. Keshishzadeh, K. Fischer, and M. Shakibaei. 2008. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochemical pharmacology*. 75:677-687.
- Chen, Q., B. Zhang, T. Yi, and C. Xia. 2012. Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase C β in chondrocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 50:137-143.
- Christodoulou, C., and E.H. Choy. 2006. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*. 6:13-19.
- Chu, C.Q., M. Field, M. Feldmann, and R.N. Maini. 1991. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 34:1125-1132.
- Chuang, E., and M.E. Molitch. 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 78 Suppl 1:255-261.
- D'Angelo, G., J.F. Martini, T. Iiri, W.J. Fantl, J. Martial, and R.I. Weiner. 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Molecular endocrinology*. 13:692-704.
- DaSilva, L., H. Rui, R.A. Erwin, O.M. Howard, R.A. Kirken, M.G. Malabarba, R.H. Hackett, A.C. Lerner, and W.L. Farrar. 1996. Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580. *Mol Cell Endocrinol*. 117:131-140.
- Dayer, J.M. 2003. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 42 Suppl 2:ii3-10.
- Disler, D.G., M.P. Recht, and T.R. McCauley. 2000. MR imaging of articular cartilage. *Skeletal radiology*. 29:367-377.
- Duenas, Z., L. Torner, A.M. Corbacho, A. Ochoa, G. Gutierrez-Ospina, F. Lopez-Barrera, F.A. Barrios, P. Berger, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative ophthalmology & visual science*. 40:2498-2505.
- Farrell, A.J., D.R. Blake, R.M. Palmer, and S. Moncada. 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 51:1219-1222.
- Ferraris, J., D.B. Radl, S. Zarate, G. Jaita, G. Eijo, V. Zaldivar, C. Clapp, A. Seilicovich, and D. Pisera. 2011. N-terminal prolactin-derived fragments, vaso-inhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS one*. 6:e21806.
- Firestein, G.B., RC.; Harris, ED Jr.; McInnes, IB.; Ruddy S.; Sargent, JS. 2008. Kelley's Textbook of Rheumatology: Expert consult premium edition. 8th Edition:1902.
- Fojtikova, M., J. Tomasova Studynkova, M. Filkova, Z. Lacinova, J. Gatterova, K. Pavelka, J. Vencovsky, and L. Senolt. 2010. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid

- arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clinical and experimental rheumatology*. 28:849-854.
- Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant, and G. Nagy. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*. 80:1523-1631.
- Freemark, M., P. Driscoll, R. Maaskant, A. Petryk, and P.A. Kelly. 1997. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *The Journal of clinical investigation*. 99:1107-1117.
- Furuzawa-Carballeda, J., P.M. Macip-Rodriguez, and A.R. Cabral. 2008. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clinical and experimental rheumatology*. 26:554-560.
- Galfione, M., W. Luo, J. Kim, D. Hawke, R. Kobayashi, C. Clapp, L.Y. Yu-Lee, and S.H. Lin. 2003. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein expression and purification*. 28:252-258.
- Gaytan, F., C. Morales, C. Bellido, E. Aguilar, and J.E. Sanchez-Criado. 1997. Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. *Biology of reproduction*. 57:478-486.
- Ge, G., C.A. Fernandez, M.A. Moses, and D.S. Greenspan. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:10010-10015.
- Goffin, V., S. Bernichtein, P. Touraine, and P.A. Kelly. 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocrine reviews*. 26:400-422.
- Goffin, V., N. Binart, P. Clement-Lacroix, B. Bouchard, C. Bole-Feysot, M. Edery, B.K. Lucas, P. Touraine, A. Pezet, R. Maaskant, C. Pichard, C. Helloco, N. Baran, H. Favre, S. Bernichtein, A. Allamando, C. Ormandy, and P.A. Kelly. 1999. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic analysis : biomolecular engineering*. 15:189-201.
- Goggs, R., S.D. Carter, G. Schulze-Tanzil, M. Shakibaei, and A. Mobasheri. 2003. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J*. 166:140-158.
- Goldring, M.B. 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 43:1916-1926.
- Goldring, M.B. 2006. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 20:1003-1025.
- Gorman, C.L., and A.P. Cope. 2008. Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 22:221-238.

- Gouwy, M., S. Struyf, P. Proost, and J. Van Damme. 2005. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine & growth factor reviews*. 16:561-580.
- Gravallese, E.M., Y. Harada, J.T. Wang, A.H. Gorn, T.S. Thornhill, and S.R. Goldring. 1998. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*. 152:943-951.
- Guzmán-Morales, J. 2008. Análisis del efecto antiapoptótico de la PRL sobre el cartílago articular. *TESIS*. Doctorado en Ciencias Biomédicas:60 pp.
- Haga, H.J., A. Martin Moreno, D. Terp Andersen, and E. Peen. 2014. Serum-prolactin and the association to disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Research in Endocrinology*. 2014:1-6.
- Hashimoto, S., R.L. Ochs, S. Komiya, and M. Lotz. 1998. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 41:1632-1638.
- Hauselmann, H.J., M. Stefanovic-Racic, B.A. Michel, and C.H. Evans. 1998. Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. *Journal of immunology*. 160:1444-1448.
- Heinegard, D., and A. Oldberg. 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 3:2042-2051.
- Hilfiker-Kleiner, D., K. Kaminski, E. Podewski, T. Bonda, A. Schaefer, K. Sliwa, O. Forster, A. Quint, U. Landmesser, C. Doerries, M. Luchtefeld, V. Poli, M.D. Schneider, J.L. Balligand, F. Desjardins, A. Ansari, I. Struman, N.Q. Nguyen, N.H. Zschemisch, G. Klein, G. Heusch, R. Schulz, A. Hilfiker, and H. Drexler. 2007. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*. 128:589-600.
- Holmval, K., L. Camper, S. Johansson, J.H. Kimura, and E. Lundgren-Akerlund. 1995. Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Experimental cell research*. 221:496-503.
- Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 191:313-320.
- Huang, Q.Q., R.E. Koessler, R. Birkett, A. Dorfleutner, H. Perlman, G.K. Haines, 3rd, C. Stehlik, C.V. Nicchitta, and R.M. Pope. 2012. Glycoprotein 96 perpetuates the persistent inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 64:3638-3648.
- Huber, L.C., O. Distler, I. Tarnier, R.E. Gay, S. Gay, and T. Pap. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 45:669-675.

- Hummer, M., and J. Huber. 2004. Hyperprolactinaemia and antipsychotic therapy in schizophrenia. *Curr Med Res Opin.* 20:189-197.
- Humphreys, R.C., and L. Hennighausen. 1999. Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.* 10:685-694.
- Hunter, D.J., and D.T. Felson. 2006. Osteoarthritis. *Bmj.* 332:639-642.
- Hunter, S., B.L. Koch, and S.M. Anderson. 1997. Phosphorylation of cbl after stimulation of Nb2 cells with prolactin and its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol.* 11:1213-1222.
- Iwanaga, T., M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase, and K. Nozawa-Inoue. 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of histology and cytology.* 63:17-31.
- Jay, G.D., K.A. Elsaid, J. Zack, K. Robinson, F. Trespacios, C.J. Cha, and C.O. Chichester. 2004. Lubricating ability of aspirated synovial fluid from emergency department patients with knee joint synovitis. *The Journal of rheumatology.* 31:557-564.
- Jeffrey, D.R., and I. Watt. 2003. Imaging hyaline cartilage. *The British journal of radiology.* 76:777-787.
- Juarez, M., A. Filer, and C.D. Buckley. 2012. Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss medical weekly.* 142:w13529.
- Kamimoto, M., M. Kikuchi, T. Yashiro, A. Nihe, Y. Kariya, and Y. Hoshino. 2003. Immunohistochemical study of the proliferation modality of synovium in rat adjuvant arthritis. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association.* 8:400-407.
- Kapur, S., R. Zipursky, C. Jones, G. Remington, and S. Houle. 2000. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 157:514-520.
- Karlson, E.W., L.A. Mandl, S.E. Hankinson, and F. Grodstein. 2004. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis and rheumatism.* 50:3458-3467.
- Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO journal.* 10:4025-4031.
- Kim, H.A., M.L. Cho, H.Y. Choi, C.S. Yoon, J.Y. Jhun, H.J. Oh, and H.Y. Kim. 2006. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis and rheumatism.* 54:2152-2163.
- Kim, H.A., and Y.W. Song. 1999. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 42:1528-1537.

- Kim, S.J., J.W. Ju, C.D. Oh, Y.M. Yoon, W.K. Song, J.H. Kim, Y.J. Yoo, O.S. Bang, S.S. Kang, and J.S. Chun. 2002. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *The Journal of biological chemistry*. 277:1332-1339.
- Knudson, W., and R.F. Loeser. 2002. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 59:36-44.
- Ko, J.Y., Y.L. Ahn, and B.N. Cho. 2003. Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactin-expressing plasmid into muscle. *Molecules and cells*. 15:262-270.
- Kouri, J.B., J.M. Aguilera, J. Reyes, K.A. Lozoya, and S. Gonzalez. 2000. Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *The Journal of rheumatology*. 27:1005-1019.
- Krishnan, N., O. Thellin, D.J. Buckley, N.D. Horseman, and A.R. Buckley. 2003. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology*. 144:2102-2110.
- Kuettner, K.E. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clinical biochemistry*. 25:155-163.
- Lotz, M. 1999. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 25:269-282.
- Lotz, M. 2001. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res*:S108-115.
- Macotela, Y., M.B. Aguilar, J. Guzman-Morales, J.C. Rivera, C. Zermeno, F. Lopez-Barrera, G. Nava, C. Lavalle, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science*. 119:1790-1800.
- Mangoura, D., C. Pelletiere, S. Leung, N. Sakellaridis, and D.X. Wang. 2000. Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 18:693-704.
- Martel-Pelletier, J., C. Boileau, J.P. Pelletier, and P.J. Roughley. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 22:351-384.
- Martini, J.F., C. Piot, L.M. Humeau, I. Struman, J.A. Martial, and R.I. Weiner. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular endocrinology*. 14:1536-1549.
- Mateo, L., J.M. Nolla, M.R. Bonnin, M.A. Navarro, and D. Roig-Escofet. 1998. High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 25:2077-2082.

- McCartney-Francis, N., J.B. Allen, D.E. Mizel, J.E. Albina, Q.W. Xie, C.F. Nathan, and S.M. Wahl. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *The Journal of experimental medicine*. 178:749-754.
- McCauley, T.R., and D.G. Disler. 1998. MR imaging of articular cartilage. *Radiology*. 209:629-640.
- McInnes, I.B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 7:429-442.
- Muller-Ladner, U., C. Ospelt, S. Gay, O. Distler, and T. Pap. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 9:223.
- Nagafuchi, H., N. Suzuki, A. Kaneko, T. Asai, and T. Sakane. 1999. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 26:1890-1900.
- Ogueta, S., J. Munoz, E. Obregon, E. Delgado-Baeza, and J.P. Garcia-Ruiz. 2002. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 190:51-63.
- Olazabal, I., J. Munoz, S. Ogueta, E. Obregon, and J.P. Garcia-Ruiz. 2000. Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation: inhibition by glucocorticoids. *Molecular endocrinology*. 14:564-575.
- Olee, T., S. Hashimoto, J. Quach, and M. Lotz. 1999. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *Journal of immunology*. 162:1096-1100.
- Orbach, H., G. Zandman-Goddard, H. Amital, V. Barak, Z. Szekanecz, G. Szucs, K. Danko, E. Nagy, T. Csepány, J.F. Carvalho, A. Doria, and Y. Shoenfeld. 2007. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1109:385-400.
- Ormandy, C.J., A. Camus, J. Barra, D. Damotte, B. Lucas, H. Buteau, M. Edery, N. Brousse, C. Babinet, N. Binart, and P.A. Kelly. 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & development*. 11:167-178.
- Paredes, Y., F. Massicotte, J.P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, S. Laufer, and D. Lajeunesse. 2002. Study of the role of leukotriene B(4) in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis and rheumatism*. 46:1804-1812.
- Pavlovich, R.I., and J. Lubowitz. 2008. Current concepts in synovial tissue of the knee joint. *Orthopedics*. 31:160-163; quiz 164-165.
- Pearle, A.D., R.F. Warren, and S.A. Rodeo. 2005. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in sports medicine*. 24:1-12.

- Pelletier, J.P., J. Martel-Pelletier, and S.B. Abramson. 2001. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis and rheumatism*. 44:1237-1247.
- Piwnica, D., P. Touraine, I. Struman, S. Tabruyn, G. Bolbach, C. Clapp, J.A. Martial, P.A. Kelly, and V. Goffin. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular endocrinology*. 18:2522-2542.
- Polzer, K., G. Schett, and J. Zwerina. 2007. The lonely death: chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis. *Autoimmunity*. 40:333-336.
- Rohner, E., G. Matziolis, C. Perka, B. Fuchtmeier, T. Gaber, G.R. Burmester, F. Buttgereit, and P. Hoff. 2012. Inflammatory synovial fluid microenvironment drives primary human chondrocytes to actively take part in inflammatory joint diseases. *Immunol Res*. 52:169-175.
- Rovensky, J., R. Kvetnansky, Z. Radikova, R. Imrich, O. Greguska, M. Vigas, and L. Macho. 2005. Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 23:292-296.
- Sakurai, H., H. Kohsaka, M.F. Liu, H. Higashiyama, Y. Hirata, K. Kanno, I. Saito, and N. Miyasaka. 1995. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *The Journal of clinical investigation*. 96:2357-2363.
- Salter, D.M. 1998. The tissues we deal with (II) cartilage. *Current Orthopaedics*. 12:251-257.
- Sandell, L.J., and T. Aigner. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis research*. 3:107-113.
- Scanzello, C.R., and S.R. Goldring. 2012. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 51:249-257.
- Scott, D.L. 2007. Early rheumatoid arthritis. *British medical bulletin*. 81-82:97-114.
- Schlaak, J.F., I. Pfers, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and E. Marker-Hermann. 1996. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clinical and experimental rheumatology*. 14:155-162.
- Schmidt, T.A., N.S. Gastelum, Q.T. Nguyen, B.L. Schumacher, and R.L. Sah. 2007. Boundary lubrication of articular cartilage: role of synovial fluid constituents. *Arthritis and rheumatism*. 56:882-891.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 75:163-189.
- Schuerwegh, A.J., E.J. Dombrecht, W.J. Stevens, J.F. Van Offel, C.H. Bridts, and L.S. De Clerck. 2003. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 11:681-687.

- Schumacher, B.L., C.E. Hughes, K.E. Kuettnner, B. Caterson, and M.B. Aydelotte. 1999. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 17:110-120.
- Seriolo, B., V. Ferretti, A. Sulli, D. Fasciolo, and M. Cutolo. 2002. Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 966:258-262.
- Siddiquee, K., S. Zhang, W.C. Guida, M.A. Blaskovich, B. Greedy, H.R. Lawrence, M.L. Yip, R. Jove, M.M. McLaughlin, N.J. Lawrence, S.M. Sebti, and J. Turkson. 2007. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7391-7396.
- Sinha, Y.N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine reviews*. 16:354-369.
- Smith, J.B., and M.K. Haynes. 2002. Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Annals of internal medicine*. 136:908-922.
- Song, Y.W., and E.H. Kang. 2010. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 103:139-146.
- Stichtenoth, D.O., F.M. Gutzki, D. Tsikas, N. Selve, S.M. Bode-Boger, R.H. Boger, and J.C. Frolich. 1994. Increased urinary nitrate excretion in rats with adjuvant arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 53:547-549.
- Suemoto, H., Y. Muragaki, K. Nishioka, M. Sato, A. Ooshima, S. Itoh, I. Hatamura, M. Ozaki, A. Braun, E. Gustafsson, and R. Fassler. 2007. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Developmental biology*. 312:572-581.
- Tabruyn, S.P., C.M. Sorlet, F. Rentier-Delrue, V. Bours, R.I. Weiner, J.A. Martial, and I. Struman. 2003. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular endocrinology*. 17:1815-1823.
- Teixeira, C.C., K. Mansfield, C. Hertkorn, H. Ischiropoulos, and I.M. Shapiro. 2001. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281:C833-839.
- Tessier, C., A. Prigent-Tessier, S. Ferguson-Gottschall, Y. Gu, and G. Gibori. 2001. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology*. 142:4086-4094.
- Torner, L., S. Mejia, F.J. Lopez-Gomez, A. Quintanar, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology*. 136:5454-5460.

- Tzeng, S.J., and D.I. Linzer. 1997. Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Molecular reproduction and development*. 48:45-52.
- Wang, H., Z. Wang, J. Chen, and J. Wu. 2007. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes. *Cell biology international*. 31:1027-1035.
- Westacott, C.I., and M. Sharif. 1996. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Seminars in arthritis and rheumatism*. 25:254-272.
- Westacott, C.I., J.T. Whicher, I.C. Barnes, D. Thompson, A.J. Swan, and P.A. Dieppe. 1990. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 49:676-681.
- Wilkins, R.J., J.A. Browning, and J.C. Ellory. 2000. Surviving in a matrix: membrane transport in articular chondrocytes. *The Journal of membrane biology*. 177:95-108.
- Wu, G.J., T.G. Chen, H.C. Chang, W.T. Chiu, C.C. Chang, and R.M. Chen. 2007. Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *J Cell Biochem*. 101:1520-1531.
- Yamaji, T., K. Shimamoto, M. Ishibashi, K. Kosaka, and H. Orimo. 1976. Effect of age and sex on circulating and pituitary prolactin levels in human. *Acta endocrinologica*. 83:711-719.
- Yatsugi, N., T. Tsukazaki, M. Osaki, T. Koji, S. Yamashita, and H. Shindo. 2000. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 5:150-156.
- Yu, L., L. Wang, and S. Chen. 2010. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of cellular and molecular medicine*. 14:2592-2603.
- Zermeno, C., J. Guzman-Morales, Y. Macotela, G. Nava, F. Lopez-Barrera, J.B. Kouri, C. Lavallo, G.M. de la Escalera, and C. Clapp. 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *The Journal of endocrinology*. 189:R1-8.
- Zwerina, J., K. Redlich, K. Polzer, L. Joosten, G. Kronke, J. Distler, A. Hess, N. Pundt, T. Pap, O. Hoffmann, J. Gasser, C. Scheinecker, J.S. Smolen, W. van den Berg, and G. Schett. 2007. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:11742-11747.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Articulación sinovial de rodilla -----	-3
Figura 2. Estructura molecular y celular del cartílago articular -----	-5
Figura 3. Fotomicrografía de una sección sagital de rodilla de rata teñida con hematoxilina y eosina -----	-8
Figura 4. Sinovio en condiciones inflamatorias -----	-9
Figura 5. Activación del sistema PRL/RPRL -----	-18
Figura 6. Generación de vasoinhibinas a partir del corte proteolítico de la PRL -----	-20
Figura 7. La PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por Cit y su efecto es dosis-dependiente -----	-37
Figura 8. La PRL inhibe la activación de la caspasa-3 inducida por Cit -----	-38
Figura 9. La PRL inhibe la expresión de la p53 inducida por Cit -----	-39
Figura 10. La PRL reduce el cociente de las proteínas Bax/Bcl-2 inducido por Cit ---	-39
Figura 11. La PRL no modifica los niveles de la proteína iNOS ni del NO incrementados por Cit en condrocitos -----	-40
Figura 12. La PRL fosforila/activa a la JAK2 e induce la translocación de la STAT3 al núcleo de los condrocitos -----	-42
Figura 13. La inhibición de la activación de la STAT3 induce la apoptosis de los condrocitos -----	-43
Figura 14. Desarrollo temporal de la AIA en la rata -----	-44
Figura 15. Hiperprolactinemia inducida con minibombas de infusión de PRL o por el tratamiento con Hal -----	-45
Figura 16. La PRL y el Hal previenen la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA -----	-47
Figura 17. Hiperprolactinemia inducida con minibombas de infusión de PRL -----	-48
Figura 18. La PRL mitiga la apoptosis de los condrocitos de ratas con AIA establecida -----	-49
Figura 19. Las Cit favorecen la proteólisis de PRL por condrocitos en cultivo -----	-51
Figura 20. Proteólisis de PRL hacia Vi inducida por la inyección intra-articular de Cit -----	-52
Figura 21. Las Vi inducen la apoptosis de los condrocitos -----	-53
Figura 22. La apoptosis inducida por Vi no involucra el incremento de iNOS/NO -----	-54

XII. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Autoantígenos reconocidos en la AR -----	-11
Tabla 2. Secuencias específicas de oligos para la amplificación de genes proapoptóticos -----	-34

XIII. ANEXOS

A continuación se citan las actividades académicas sobresalientes realizadas durante mis estudios doctorales.

PUBLICACIONES:

1. 2013; 08 **Norma Adán**, Jessica Guzmán-Morales, María G. Ledesma-Colunga, Sonia I. Perales-Canales, Andrés Quintanar-Stéphano, Fernando López-Barrera, Isabel Méndez, Bibiana Moreno-Carranza, Jakob Triebel, Nadine Binart, Gonzalo Martínez de la Escalera, Stéphanie Thebault, Carmen Clapp. **Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis.** *J Clin Invest.* 2013;123(9):3902–3913.
2. 2013; 08 Bibiana Moreno-Carranza, Maite Goya-Arce, Claudia Vega, **Norma Adán**, Jakob Triebel, Fernando Lopez-Barrera, Andrés Quintanar-Stephano, Nadine Binart, Gonzalo Martinez de la Escalera, and Carmen Clapp. **Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: Effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 305(7):R720-R206.
3. 2014; 01 Edith Arnold, Stephanie Thebault, Germán Baeza-Cruz, David Arredondo, **Norma Adán**, Andrés Quintanar-Stéphano, Miguel Condés-Lara, Gerardo Rojas-Piloni, Gonzalo Martínez de la Escalera, Carmen Clapp. **The hormone prolactin is a novel, endogenous trophic factor able to regulate reactive glia and to limit retinal degeneration.** *J Neurosci.* 2014; 34(5):1868-1878.
4. 2014; 02 **Norma Adán**, María G. Ledesma-Colunga, Ana L. Reyes-López, Gonzalo Martínez de la Escalera, Carmen Clapp. **Arthritis and prolactin: A phylogenetic viewpoint.** *Gen Comp Endocrinol.* 2014; 203:132-136.
5. 2014; 06 Zamorano M, Ledesma-Colunga MG, **Adán N**, Vera-Massieu C, Lemini M, Méndez I, Moreno-Carranza B, Neumann ID, Thebault S, Martínez de la Escalera G, Torner L, Clapp C. **Prolactin-derived vaso-inhibins increase anxiety- and depression-related behaviors.** *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 44:123-32.

PREMIOS:

1. 2011; 09 **Segundo lugar** en la Exposición de carteles en el XVIII Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM. Trabajo presentado: La prolactina previene la apoptosis de los condrocitos inducida por citocinas pro-inflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro*. Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre, 2012.
2. 2012; 07 **Travel Awards** por “The Endocrine Society” y “The FASEB Science Research Conference” en el marco de las conferencias "The GH/PRL

Family in Biology and Disease", por la presentación oral del trabajo intitulado "PRL inhibits chondrocyte apoptosis and joint inflammation induced by proinflammatory cytokines and arthritis in rats". Snowmass Village, Colorado, EU. Julio, 2012.

3. 2013; 05 **Award** para el "**Best Poster Presentation**", en el "Second Meeting of the NASCE" por la presentación del trabajo intitulado "Prolactin inhibits chondrocyte apoptosis induced by proinflammatory cytokines and arthritis in rats". Juriquilla, Querétaro, México. Mayo, 2013.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN:

1. 2014; 05-07 Estancia realizada en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Granada, España. Bajo la supervisión del Dr. Mario Delgado Mora se evaluó el "Efecto del neuropéptido cortistatina en poblaciones gliales en condiciones de estrés oxidativo y procesos de fagocitosis". Duración de la estancia: 3 meses.



Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis

Norma Adán,¹ Jessica Guzmán-Morales,¹ Maria G. Ledesma-Colunga,¹ Sonia I. Perales-Canales,¹ Andrés Quintanar-Stéphano,² Fernando López-Barrera,¹ Isabel Méndez,¹ Bibiana Moreno-Carranza,¹ Jakob Triebel,¹ Nadine Binart,³ Gonzalo Martínez de la Escalera,¹ Stéphanie Thebault,¹ and Carmen Clapp¹

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México. ²Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. ³INSERM U693, Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Chondrocytes are the only cells in cartilage, and their death by apoptosis contributes to cartilage loss in inflammatory joint diseases, such as rheumatoid arthritis (RA). A putative therapeutic intervention for RA is the inhibition of apoptosis-mediated cartilage degradation. The hormone prolactin (PRL) frequently increases in the circulation of patients with RA, but the role of hyperprolactinemia in disease activity is unclear. Here, we demonstrate that PRL inhibits the apoptosis of cultured chondrocytes in response to a mixture of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ) by preventing the induction of p53 and decreasing the BAX/BCL-2 ratio through a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. Local treatment with PRL or increasing PRL circulating levels also prevented chondrocyte apoptosis evoked by injecting cytokines into the knee joints of rats, whereas the proapoptotic effect of cytokines was enhanced in PRL receptor-null (*Prlr*^{-/-}) mice. Moreover, eliciting hyperprolactinemia in rats before or after inducing the adjuvant model of inflammatory arthritis reduced chondrocyte apoptosis, proinflammatory cytokine expression, pannus formation, bone erosion, joint swelling, and pain. These results reveal the protective effect of PRL against inflammation-induced chondrocyte apoptosis and the therapeutic potential of hyperprolactinemia to reduce permanent joint damage and inflammation in RA.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune inflammatory disease with a worldwide prevalence of 1% to 2%. Autoimmunity followed by the articular infiltration of leukocytes and hyperplasia of synovial cells lead to the development of an invasive inflammatory pannus that destroys the adjacent cartilage and bone. Locally produced cytokines are crucial for initiating the inflammatory process and destroying articular tissue (1). Among these cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ stimulate both chondrocyte apoptosis and cartilage extracellular matrix degradation, and their inhibition ameliorates joint destruction (1–4). Transgenic mice expressing TNF- α , a model of polyarthritis (5), display chondrocyte apoptosis before the onset of full arthritis, suggesting that cytokine-induced chondrocyte apoptosis is a primary cause of, rather than an event secondary to, cartilage matrix breakdown (6). Thus, factors able to counteract chondrocyte apoptosis under inflammatory conditions are relevant for the treatment of RA (7–11). One such factor is prolactin (PRL).

PRL acts both as a circulating hormone and a cytokine to regulate the function of a wide variety of tissues, including cartilage. PRL and the PRL receptor are expressed in chondrocytes (12, 13), where this hormone can promote differentiation and survival. PRL

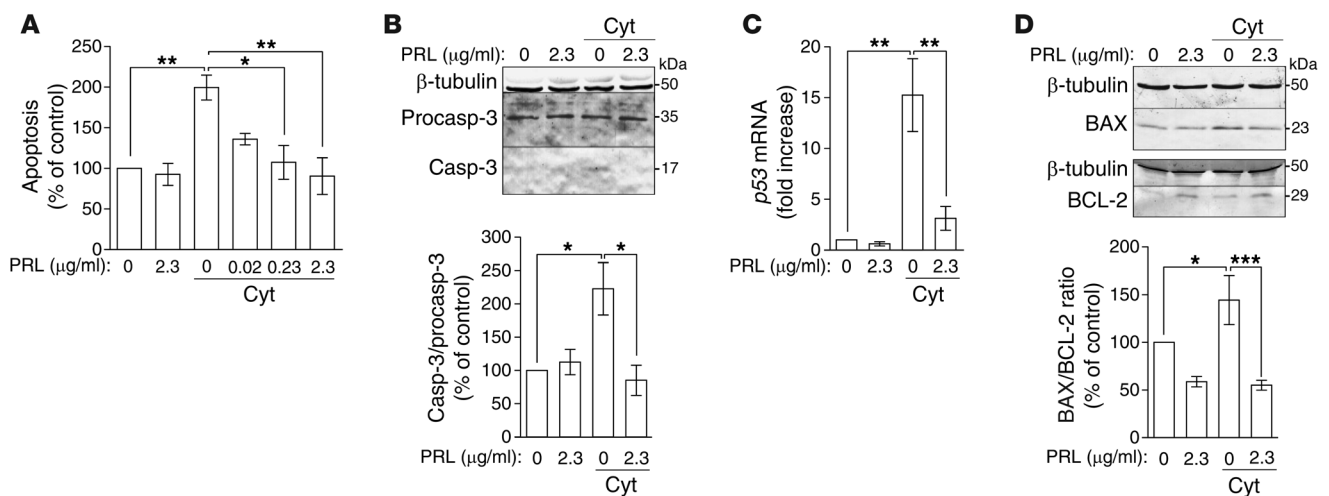
stimulates the synthesis of proteoglycans and type II collagen by bone marrow-derived chondrocytic mesenchymal cells (14), and it inhibits the apoptosis of articular chondrocytes induced by serum deprivation (13). The action of PRL on chondrocyte survival may be relevant in RA. PRL is present in RA synovial fluid (14, 15), is produced by RA synovial cells (16), and can influence cartilage survival by exerting immunoregulatory effects. The PRL receptor is a member of the hematopoietin/cytokine receptor superfamily and is expressed in a variety of immune cells, in which this hormone can be proinflammatory or antiinflammatory by regulating proliferation, survival, and the release of inflammatory mediators (17).

Given that cytokine-induced chondrocyte apoptosis contributes to cartilage destruction in RA (1, 2, 6, 9), we investigated the survival effect of PRL on chondrocytes treated *in vitro* or *in vivo* with a mixture of TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ (Cyt) and whether this effect protects against cartilage destruction in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis in rats. We demonstrate that PRL treatment inhibits, and PRL receptor deficiency enhances, Cyt-induced cartilage apoptosis and that the PRL effect on survival occurs in chondrocytes via a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. We also show that hyperprolactinemia promotes the survival of arthritic cartilage by blocking the expression of proinflammatory cytokines and their proapoptotic effect on chondrocytes and that PRL delays the onset and ameliorates the severity of inflammatory arthritis. We conclude that current medications able to increase prolactinemia constitute novel potential therapies to control inflammation-driven cartilage degradation and joint damage in RA.

Authorship note: Norma Adán, Jessica Guzmán-Morales, and Maria G. Ledesma-Colunga contributed equally to this work. Sonia I. Perales-Canales is deceased.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest*. 2013;123(9):3902–3913. doi:10.1172/JCI69485.

**Figure 1**

PRL inhibits Cyt-induced apoptosis of chondrocytes in culture. (A) Primary cultures of rat chondrocytes were challenged with Cyt, combined or not with different concentrations of PRL, and apoptosis was evaluated at 24 hours by ELISA ($n = 3-6$). (B) Representative Western blot of procaspase-3 and active caspase-3 (Procasp-3 and Casp-3, respectively) in lysates of chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 6 hours. The graph shows the quantification of active caspase-3 by densitometry after normalization to procaspase-3 ($n = 3$). (C) qRT-PCR-based quantification of *p53* mRNA levels ($n = 3$) in chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 24 hours. (D) Representative Western blot of BAX and BCL-2 in chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 4 hours. The graph shows the quantification of BAX/BCL-2 by densitometry ($n = 3$). Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Results

PRL blocks Cyt-induced apoptosis of chondrocytes in culture by a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. We first studied whether PRL can act on chondrocytes to inhibit the proapoptotic effect of Cyt using primary cultures of rat articular chondrocytes. Cyt induced a 2-fold increase in chondrocyte apoptosis, as determined by chondrocyte internucleosomal DNA fragmentation measured by ELISA, and this increase was blocked in a dose-dependent manner by the coadministration of PRL (Figure 1A). The antiapoptotic effect of PRL was confirmed by Western blot analysis of procaspase-3 cleavage to the caspase-3 active form (Figure 1B). Cyt treatment enhanced the levels of active caspase-3 as compared with those after no treatment, and PRL blocked the Cyt-induced increase of active caspase-3. The graph in Figure 1B shows quantification of active caspase-3 after normalization for the amount of total procaspase-3 on the blot. We also investigated the expression of proteins that regulate apoptosis. Upon treatment with Cyt, there was a 15-fold increase in the mRNA expression of proapoptotic *p53*, as determined by qRT-PCR, and this increase was significantly reduced by PRL (Figure 1C). Also, Western blot analysis showed that PRL prevented the increase in the levels of proapoptotic BAX induced by Cyt and increased the levels of antiapoptotic BCL-2, resulting in a significant reduction in the BAX/BCL-2 ratio (Figure 1D).

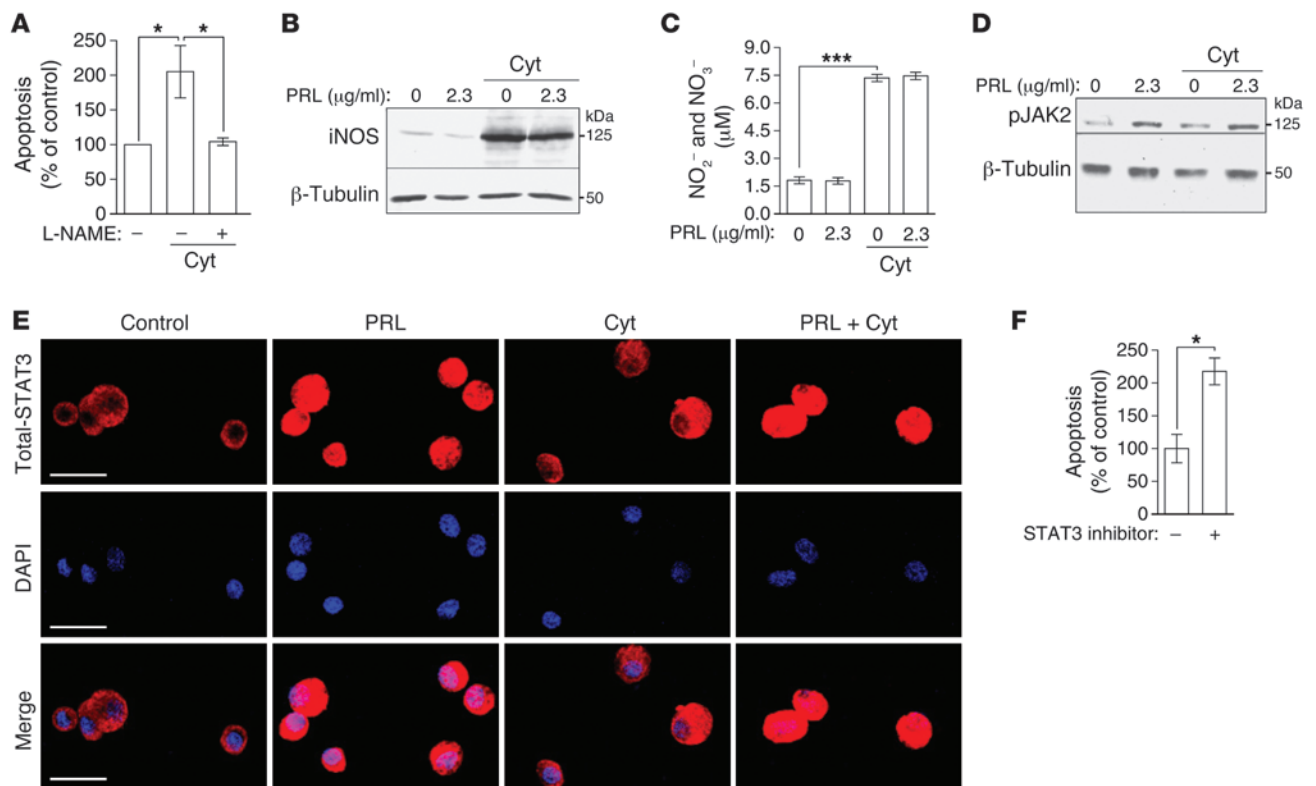
Because NO produced by iNOS is a main factor mediating the effect of TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ on chondrocyte apoptosis (3, 4, 18), we tested whether the inhibition of Cyt-induced iNOS protein expression/NO production mediates the survival effect of PRL. Similar to PRL, addition of the NOS inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (19) prevented Cyt-induced chondrocyte apoptosis (Figure 2A). However, PRL had no apparent effect on Cyt-induced upregulation of iNOS protein measured by Western blot (Figure 2B) or of the NO metabolites, nitrite (NO₂⁻) and

nitrate (NO₃⁻), evaluated by the Griess reaction (Figure 2C) in chondrocyte lysates or conditioned media, respectively. This indicates that inhibition of Cyt-induced apoptosis by PRL occurs through a NO-independent pathway. We next examined activation of JAK2/STAT3, a known PRL signaling pathway (20) that is implicated in chondrocyte survival (21). In the absence and presence of Cyt, addition of PRL to cultured chondrocytes stimulated the phosphorylation/activation of JAK2, as indicated by Western blotting (Figure 2D), and the activation of STAT3, as measured by its nuclear translocation (Figure 2E). STAT3 immunoreactivity was predominantly distributed throughout the cytoplasm, and treatment with PRL increased the localization of STAT3 immunostaining in the cell nucleus, indicative of STAT3 activation. Because incubation of chondrocytes with the STAT3 inhibitor S31-201 (22) resulted in chondrocyte apoptosis (Figure 2F), it is possible that activation of the JAK2/STAT3 pathway by PRL mediates its inhibitory effect on Cyt-induced chondrocyte apoptosis.

PRL inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by the intra-articular injection of Cyt. To assess the survival action of PRL in vivo, Cyt with or without PRL were injected into the intra-articular space of knee joints of normoprolactinemic rats. Also, Cyt were injected in rats rendered hyperprolactinemic by placing 2 anterior pituitary glands (APs) under a kidney capsule for 15 days (23). After 48 hours, Cyt-injected knees showed a positive TUNEL signal on the outer border of the articular cartilage, visualized as a continuous fluorescent line, which was absent in the vehicle-injected controls (Figure 3A). The TUNEL-positive signal was located in chondrocytes (Figure 3A, inset), in which apoptosis was confirmed by active caspase-3 immunostaining and DAPI-DNA labeling (Figure 3B). There was no positive TUNEL reaction in the articular cartilage of knees coinjected with Cyt and PRL (Figure 3C) or in AP-grafted rats injected with Cyt (Figure 3E). Inhibition of the Cyt effect by PRL and AP grafts was statistically significant after quantifying



research article

**Figure 2**

PRL inhibits Cyt-induced chondrocyte apoptosis by a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. **(A)** Apoptosis evaluated by ELISA in chondrocytes incubated with Cyt in the presence or absence of the NO inhibitor L-NAME for 24 hours ($n = 3-6$). **(B)** Western blot analysis of iNOS ($n = 3$) and **(C)** NO₂⁻ and NO₃⁻ concentrations ($n = 7$) after incubating or not incubating chondrocytes with Cyt in the absence or presence of PRL for 6 and 24 hours, respectively. **(D)** Representative Western blot of phosphorylated JAK2 (pJAK2) in chondrocytes incubated with the various treatments for 30 minutes ($n = 3$). **(E)** Representative immunostaining for total STAT3 and DAPI in cultured chondrocytes treated with or without (control) PRL (2.3 μg/ml), Cyt, or PRL and Cyt (PRL + Cyt) for 1 hour ($n = 3$). Scale bar: 25 μm. **(F)** Apoptosis evaluated by ELISA in chondrocytes incubated in the absence or presence of 100 nM STAT3 inhibitor S31-201 for 24 hours ($n = 3-4$). Bars represent mean ± SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

the TUNEL signal (Figure 3, D and F). AP transplants resulted in a significant increase in circulating PRL levels (Figure 3G). These higher PRL levels were responsible for the reduction of Cyt-induced chondrocyte apoptosis, because this reduction was abrogated (Figure 3, E and F) by lowering circulating PRL with CB154 (Figure 3G), a dopamine D2 receptor agonist that inhibits AP PRL release (24). Therefore, intra-articular treatment with PRL or induction of high prolactinemia inhibits Cyt-induced chondrocyte apoptosis.

Cyt-induced chondrocyte apoptosis is enhanced in PRL receptor-null mice. In order to explore whether endogenous PRL helps maintain chondrocyte survival under inflammatory conditions, mice null for the PRL receptor (*Prlr*^{-/-}) were injected or not with Cyt in one knee and, after 48 hours, both the injected and noninjected knees were evaluated by TUNEL. In the absence of Cyt, there was no apparent histological alteration (data not shown) or positive TUNEL signal in the articular cartilage of *Prlr*^{-/-} mice (Figure 4, A and B), indicating that PRL is not required for the survival of articular chondrocytes under normal conditions. After Cyt treatment, *Prlr*^{-/-} mice showed TUNEL staining in the articular cartilage similar to that in wild-type counterparts (Figure 4, A and B). However, in *Prlr*^{-/-} mice, but not in *Prlr*^{+/+} mice, the noninjected knee, i.e., contralateral to the knee injected with Cyt, also showed a positive TUNEL reaction

(Figure 4, C and D). These findings suggest that normal levels of PRL inhibit the proapoptotic effect of Cyt but that this action is only detected in response to lower levels of Cyt, such as those reaching a knee after contralateral intra-articular injection.

PRL prevents and reduces chondrocyte apoptosis in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis. Since PRL protects against Cyt-induced chondrocyte apoptosis, and Cyt can cause apoptosis-mediated cartilage loss in RA (1, 2, 6-9), we investigated whether PRL reduces chondrocyte apoptosis in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis in rats. Osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing haloperidol (Hal), a dopamine D2 receptor antagonist leading to hyperprolactinemia (25), were implanted 3 days before the injection of CFA (Figure 5A). On the day of CFA injection (day 0), infusion of PRL or Hal treatment elevated circulating PRL levels by 7 fold or 8 fold, respectively (Figure 5B). The hyperprolactinemic effect of PRL infusion was maintained and that of Hal decreased with time and resulted, at the end of the experiment (day 21 after CFA) (Figure 5B), in a 6-fold and 2-fold increase in serum PRL, respectively.

Consistent with cartilage destruction being a feature of adjuvant-induced arthritis (26), CFA treatment resulted in chondrocyte apoptosis, as revealed by TUNEL- and active caspase-3-

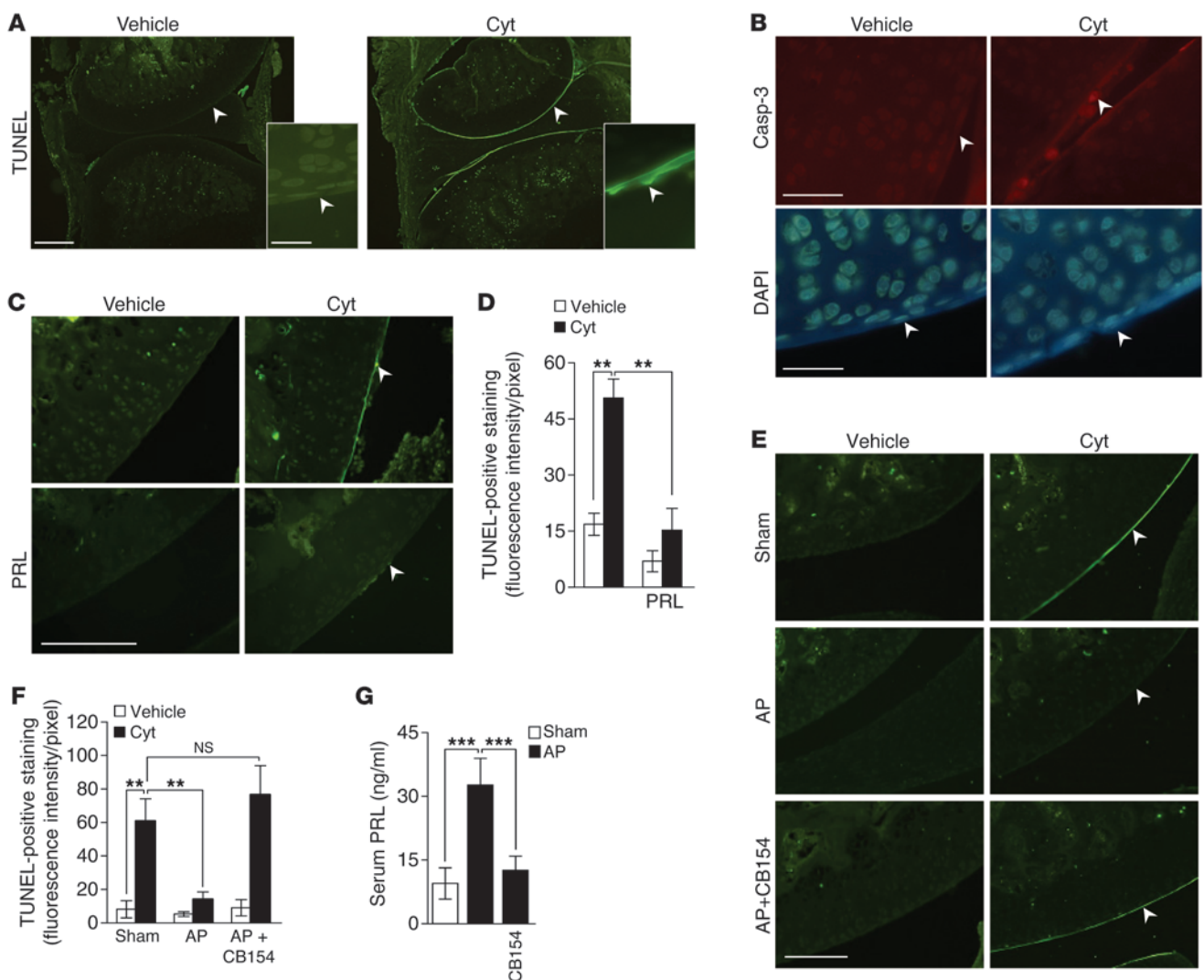


Figure 3

PRL inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by the intra-articular injection of Cyt. (**A** and **B**) Apoptosis was assessed in rat knees injected with vehicle or Cyt by TUNEL and active caspase-3 staining. The bottom right images in **A** show enlarged views of knee cartilage. Scale bar: 500 μ m (top); 25 μ m (bottom). (**B**) Nucleic acids in chondrocytes were stained by DAPI. Scale bar: 50 μ m. (**C** and **D**) TUNEL-positive staining and quantification in outer border cartilage of rat knees coinjected with Cyt and PRL ($n = 4$). Scale bar: 100 μ m. (**E** and **F**) TUNEL-positive staining and quantification in outer border cartilages of rat knees from nontransplanted (sham) and AP-transplanted rats exposed to vehicle or Cyt, in the presence or absence of dopamine D2 receptor antagonist, CB154 ($n = 4-6$). (**A-C** and **E**) White arrowheads indicate cartilage outer border. Scale bar: 250 μ m. (**G**) Serum PRL levels in sham or AP-transplanted rats treated or not with CB154 ($n = 5-10$). Bars represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

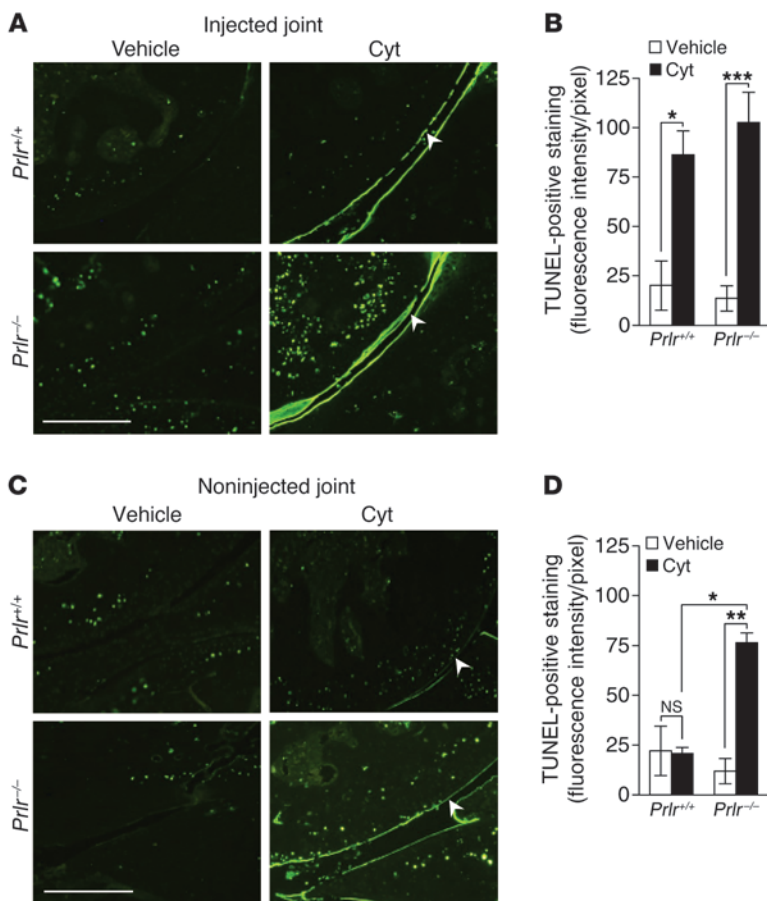
positive cells in the cartilage of knee joints on day 21 after CFA (Figure 5C), i.e., when joint swelling is at its peak, as seen below. At this time, CFA also produced a significant increase in the mRNA expression of *Casp3*, *Bax*, and *p53* in ankle joints (Figure 5D). Treatment with PRL or Hal lowered CFA-TUNEL and active caspase-3 staining and expression of proapoptotic mediators, indicating that this hormone prevents chondrocyte apoptosis in arthritic joints. We then investigated curative properties of PRL by placing osmotic minipumps delivering PRL 15 days after the injection of CFA (Figure 6A), i.e., when joint swelling is evident, as seen below. On day 21, PRL infusion had elevated serum PRL by 5 fold and 2 fold in control and CFA-treated animals, respectively (Figure 6B). Higher PRL levels correlated with reduced chondrocyte apoptosis

(Figure 6C) and lower expression of proapoptotic mediators (Figure 6D) in the CFA-injected rats. These findings suggest that high prolactinemia prevents and reduces chondrocyte apoptosis in inflammatory arthritis.

PRL prevents and reduces adjuvant-induced arthritis. Because PRL has immunoregulatory properties (17), it may also promote cartilage survival in RA by attenuating joint inflammation. Early studies reported that AP-induced hyperprolactinemia reduces CFA-induced arthritis (27) and that Hal chronically suppresses inflammation in patients with RA (28, 29). Here, we show that PRL infusion, initiated 3 days before CFA injection (Figure 7A), delayed the onset and ameliorated the severity of joint inflammation, as indicated by a reduction in hind paw swelling (ankle circumference)



research article

**Figure 4**

Cyt-induced chondrocyte apoptosis is enhanced in *Prlr*^{-/-} mice. Apoptosis was assessed by TUNEL staining in knees of *Prlr*^{-/-} and *Prlr*^{+/+} mice intra-articularly injected or not with Cyt. (A and B) Both injected and (C and D) noninjected knee joints, i.e., ipsilateral and contralateral to the injection site, respectively, were analyzed. White arrowheads indicate cartilage outer border. Scale bar: 250 μ m. Bars represent mean \pm SEM. ($n = 3-5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

cytokines produced by resident cells and infiltrating inflammatory cells leads to chondrocyte apoptosis and matrix degradation (1, 2, 6-9). Natural chondrocyte survival factors have the potential to be developed for therapeutic application. This study demonstrates for the first time that PRL inhibits cytokine- and arthritis-driven chondrocyte apoptosis. This effect involves the reduced expression of proinflammatory cytokines in joint tissue and the blockage of their proapoptotic effect at the chondrocyte level. Moreover, raising circulating PRL levels reduces joint swelling, pain, pannus formation, and bone erosion in the arthritic joint.

Consistent with previous studies (2, 32, 33), here we show that a combination of TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ stimulated the *in vitro* apoptosis of chondrocytes, as evaluated by enhanced mRNA expression of *p53*, increased BAX/BCL-2 ratio, activated caspase-3, and increased DNA fragmentation. Cyt concentrations were similar to those (1-10 ng/ml) found in synovial fluid of patients with RA with severe disease activity (34, 35) or produced by activated chondrocytes (36). PRL opposed the Cyt proapoptotic effect in a dose-dependent manner at concentrations (0.2-2.3 μ g/ml) higher than those reported in RA synovial fluid (0.007-0.02 μ g/ml) (14, 15) but similar to those (0.2-0.3 μ g/ml) circulating in pregnancy and lactation (37). Also, PRL may be higher in cartilage than in synovial fluid due to its local synthesis in chondrocytes (12). Previous findings showed that PRL attenuates the stimulatory effect of Cyt on the expression of iNOS and the production of NO in cultured fibroblasts (38) and NO is a major mediator of Cyt-induced chondrocyte apoptosis (ref. 3 and present data). In chondrocytes, however, PRL did not inhibit Cyt-induced iNOS protein expression/NO production, indicating that its survival effect is independent of NO. On the other hand, PRL activated JAK2 and STAT3, which signal to inhibit chondrocyte apoptosis. STAT3 activation promotes the survival of growth plate chondrocytes by inducing the transcription of BCL-2 (21), and we found that the pharmacological inhibition of STAT3 leads to the apoptosis of articular chondrocytes. It is possible that STAT3-independent, JAK2-dependent mechanisms also contribute to the antiapoptotic effect of PRL. Activation of JAK2 by PRL stimulates PI3K/Akt to promote the survival of various cells (39-42), and activation of Akt inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by endoplasmic reticulum stress or the osteoarthritic condition (43, 44).

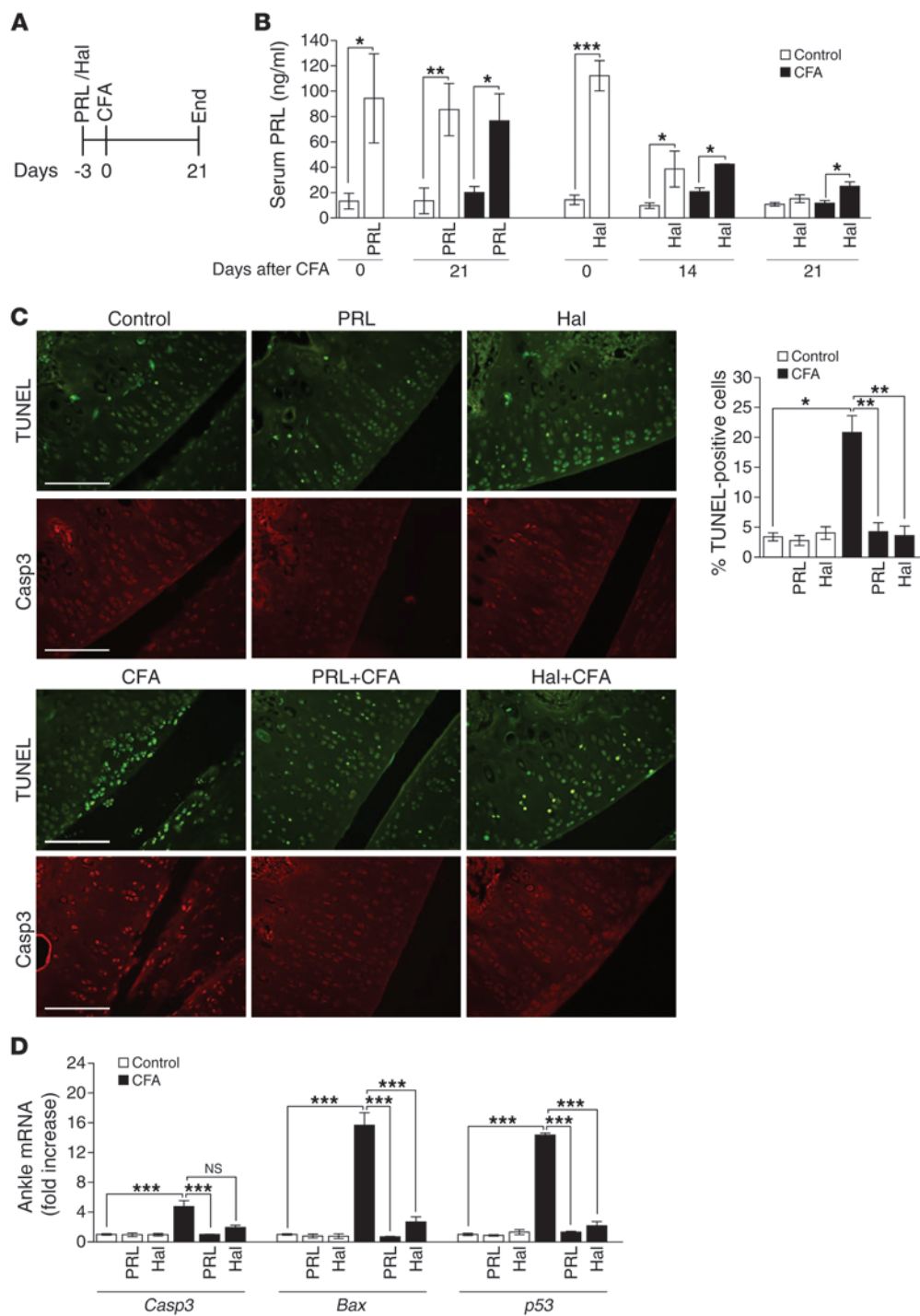
The fact that PRL activates molecular mechanisms in chondrocytes to counteract the proapoptotic effect of Cyt argues in favor of its prosurvival effect on cartilage under inflammatory

(Figure 7, B and C) and the lower mRNA expression of proinflammatory mediators (*Ifng*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa*) in the ankle joint at day 21 after CFA (Figure 7E). Also, Hal treatment 3 days before CFA (Figure 7A) counteracted inflammation even more effectively than PRL infusion. Hal suppressed ankle swelling (Figure 7F) and reduced ankle pain (Figure 7G) and proinflammatory mediator expression (Figure 7H). Consistent with these findings, the histopathological examination of knee sections stained by hematoxylin and eosin showed that PRL infusion, and to a lesser extent Hal treatment, reduced the progression of inflammatory arthritis, as revealed by the absence of pannus formation, and the thinning and destruction of bone trabeculae that occur in normoprolactinemic, adjuvant-injected rats (Figure 8).

Notably, even when started after inflammatory onset (day 15 after CFA) (Figure 9A), PRL treatment mitigated ankle swelling, pain, and expression of proinflammatory mediators (Figure 9, B-D). These findings support the antiinflammatory action of PRL and its therapeutic value for the prevention and reduction of joint destruction in inflammatory arthritis.

Discussion

Chondrocytes are responsible for the production and maintenance of the articular cartilage extracellular matrix, which largely determines the biomechanical properties of joints (30). Adult articular cartilage is postmitotic and cannot compensate for loss of chondrocytes occurring in aging (31) and in arthropathies such as osteoarthritis (3) and RA (7). In these diseases, abnormal exposure to

**Figure 5**

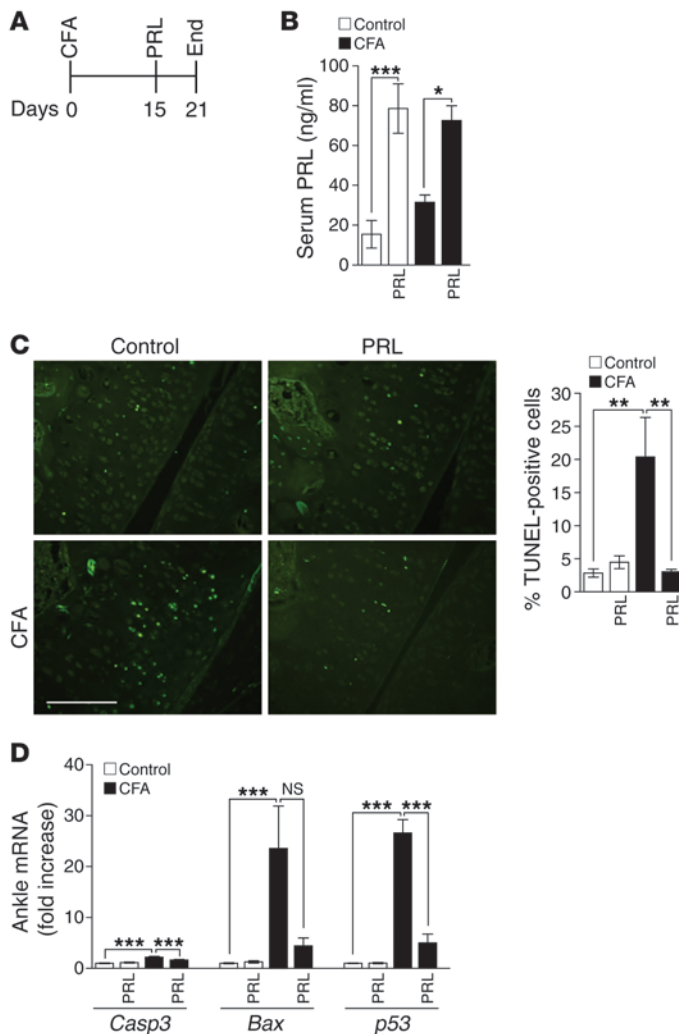
PRL and Hal prevent chondrocyte apoptosis in adjuvant-induced arthritis. **(A)** Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing Hal were placed 3 days before injecting the rats with CFA, and the experiment ended on day 21 after CFA. **(B)** Serum PRL levels on days 0 and 21 after CFA in PRL-treated rats ($n = 3-8$) and on days 0, 14, and 21 after CFA in Hal-treated rats ($n = 4-8$). **(C)** TUNEL and active caspase-3 staining of articular cartilage of knees from rats treated or not with PRL or Hal under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Scale bar: 100 μm . The graph shows the quantification of TUNEL-positive cells in articular cartilage ($n = 4-8$). **(D)** qRT-PCR-based quantification of *Casp3*, *Bax*, and *p53* mRNA levels in ankle joints from PRL- and Hal-treated rats on day 21 after CFA ($n = 5-14$). Bars represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

conditions. To investigate this concept, we extended the in vitro observations to the articular cartilage in situ. To our knowledge, this is the first report showing that the intra-articular delivery of Cyt induces the apoptosis of chondrocytes. Cyt were used at pharmacological concentrations, since, in contrast to cell-culture conditions, their intra-articular delivery results in a much shorter contact with chondrocytes (45). Apoptosis occurred at the outer surface of articular cartilage, which is the most exposed and susceptible area of the tissue. Superficial articular chondrocytes display higher numbers of IL-1 binding sites than cells in

deep cartilage (46), and enhanced iNOS expression (47) and large numbers of apoptotic chondrocytes have been reported in the superficial and middle zones of osteoarthritic (48) and RA (8) cartilage. Cotreatment with a pharmacological concentration of PRL (60 $\mu\text{g/ml}$) or increasing serum PRL to levels similar to those (0.03 $\mu\text{g/ml}$) found in the circulation of patients with RA (49) blunted Cyt-induced chondrocyte apoptosis. These findings demonstrate the survival effect of PRL on articular cartilage in vivo and suggest that systemic PRL can enter the joint to protect against chondrocyte apoptosis in RA.



research article

**Figure 6**

PRL reduces chondrocyte apoptosis in already arthritic rats. **(A)** Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL were placed 15 days after the injection of CFA in rats, and the experiment ended on day 21 after CFA. **(B)** Serum PRL levels on day 21 after CFA in PRL-treated and nontreated rats ($n = 4-8$). **(C)** TUNEL and active caspase-3 staining of articular cartilage of knees from rats treated or not with PRL under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Scale bar: 100 μm . The graph shows the quantification of TUNEL-positive cells in articular cartilage ($n = 5-8$). **(D)** qRT-PCR-based quantification of *Casp3*, *Bax*, and *p53* mRNA levels in ankle joints from PRL-treated and nontreated rats on day 21 after CFA ($n = 3-8$). Bars represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

with joint destruction. Increasing prolactinemia, either by PRL infusion or Hal treatment, before or after inducing arthritis, reduced chondrocyte apoptosis and Cyt expression in joints. Also, PRL and Hal ameliorated the severity of arthritis, as evaluated by joint swelling, pain, pannus formation, and bone erosion. The effect of Hal on joint swelling and pain was stronger than that of PRL but weaker on pannus formation and bone erosion. These differences may reflect the fact that, in addition to blocking D2 receptors on the AP, which causes the release of PRL, Hal also blocks dopamine D2 receptors on immune cells, thereby modifying both cytokine release and action (29, 54). Indeed, Cyt are key mediators of CFA-induced arthritis. Their concentration and expression are significantly elevated in serum (26) and joint tissues (present results) of CFA-injected rats, respectively, and IL-1 antagonists and TNF- α -neutralizing antibodies reduce disease severity in these animals (51, 52). We propose that PRL protects against CFA-induced inflammatory arthritis by reducing Cyt levels and counteracting their proapoptotic and proinflammatory actions on synovial cells, cartilage, and bone. However, contrary to these findings, PRL enhances proliferation of cultured RA synovial cells and their release of proinflammatory cytokines and MMP (16). While the in vitro condition may contribute to this discrepancy, in vivo evidence supporting our proposal shows that AP-induced hyperprolactinemia ameliorates CFA-induced inflammation by increasing the circulating levels of corticosterone (23, 27). Because glucocorticoids and inhibitors of TNF- α and IL-1 β are current treatments for RA (55), sustained PRL administration offers promise for mitigating susceptibility to the onset or flare-up of RA and disease severity, and current medications known to increase prolactinemia constitute therapeutic options in RA, as indicated by clinical studies using Hal (28, 29).

The idea of inducing high prolactinemia to help control the progression of joint damage in RA is novel and unexpected. A large body of literature has focused on PRL having a pathogenic role in RA and also in other autoimmune diseases, like SLE, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, celiac disease, MS, etc. Its pathogenic role is largely based on the preponderance of autoimmune diseases in women (56) and on PRL being a sex-linked hormone, on the higher levels of circulating PRL detected in some patients (6%-45%, depending on the disease and specific study), on the therapeutic effects of the dopamine agonist bromocriptine, and on the immunoenhancing properties of PRL (57-61). However, in RA, as in the other autoimmune diseases, treatment with bromocriptine is not always effective and the association between PRL levels

PRL is not essential for cartilage survival under normal conditions. Targeted disruption of the PRL receptor gene has no phenotype in endochondral bone formation (50), a process involving the apoptosis of growth plate chondrocytes, and it causes no apparent alteration indicative of a defect in articular cartilage survival (present study). However, Cyt-induced chondrocyte apoptosis was enhanced in the absence of the PRL receptor, indicating that the survival effect of PRL becomes apparent in the context of inflammation. The fact that in *Prlr*^{-/-} mice enhanced apoptosis was also seen in the knee contralateral to the one injected with the Cyt, suggests that the antiapoptotic effect of PRL depends on Cyt levels and thus, that higher values of PRL are needed to promote cartilage survival under highly inflammatory conditions.

Here, we show that increasing systemic PRL levels prevents and reduces chondrocyte apoptosis in CFA-induced arthritis. This model is well documented for the induction of inflammation within joint tissues and for having cartilage and bone destruction similar to that in RA (26, 51). Consistent with a previous study (52), we found that CFA-induced arthritis enhances the expression of apoptotic mediators in joints and showed for the first time that apoptosis occurs in large numbers of articular chondrocytes. Thus, in CFA-induced arthritis as in other models of inflammatory arthritis (53) and in RA (8), chondrocyte apoptosis is associated

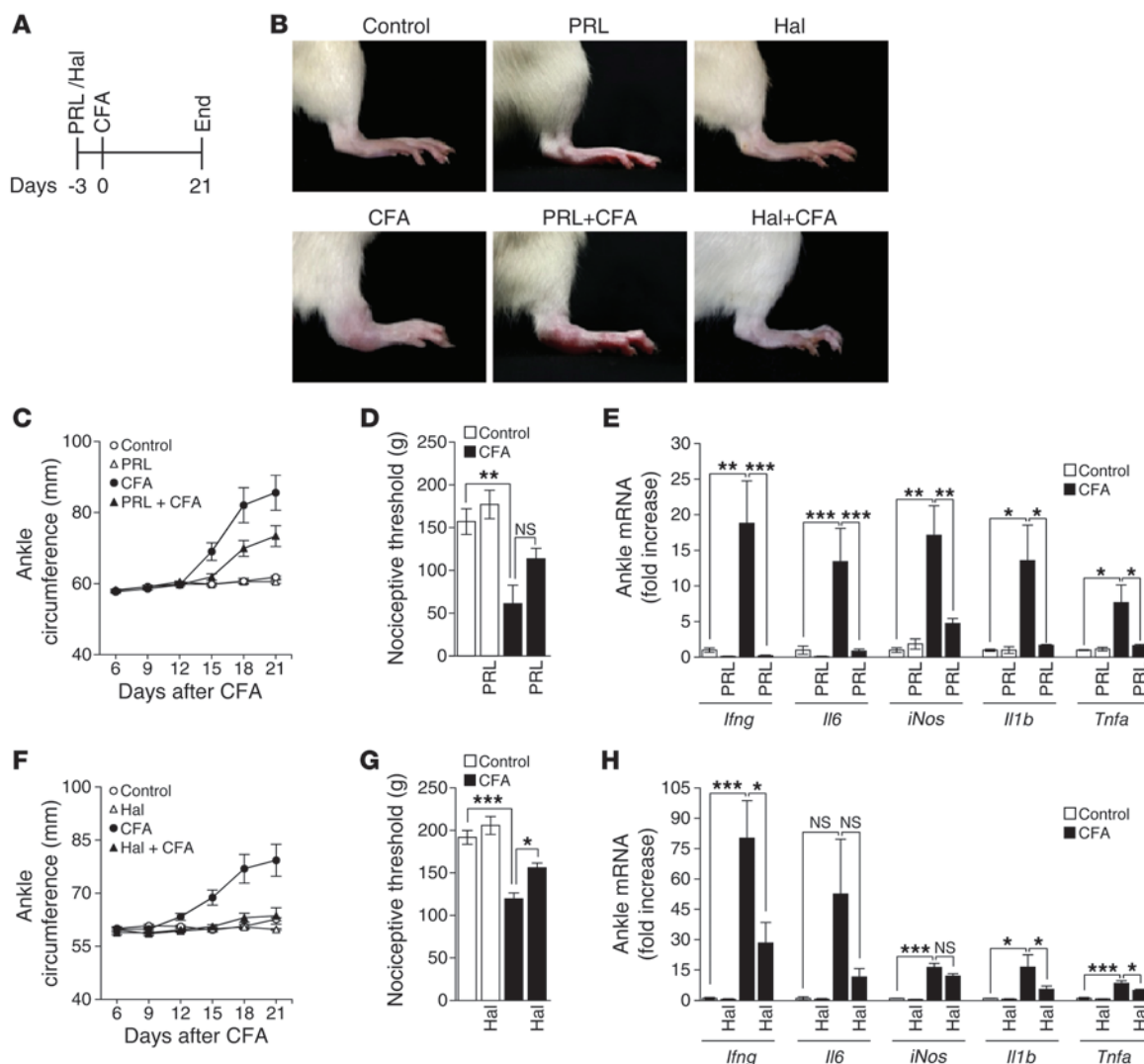


Figure 7

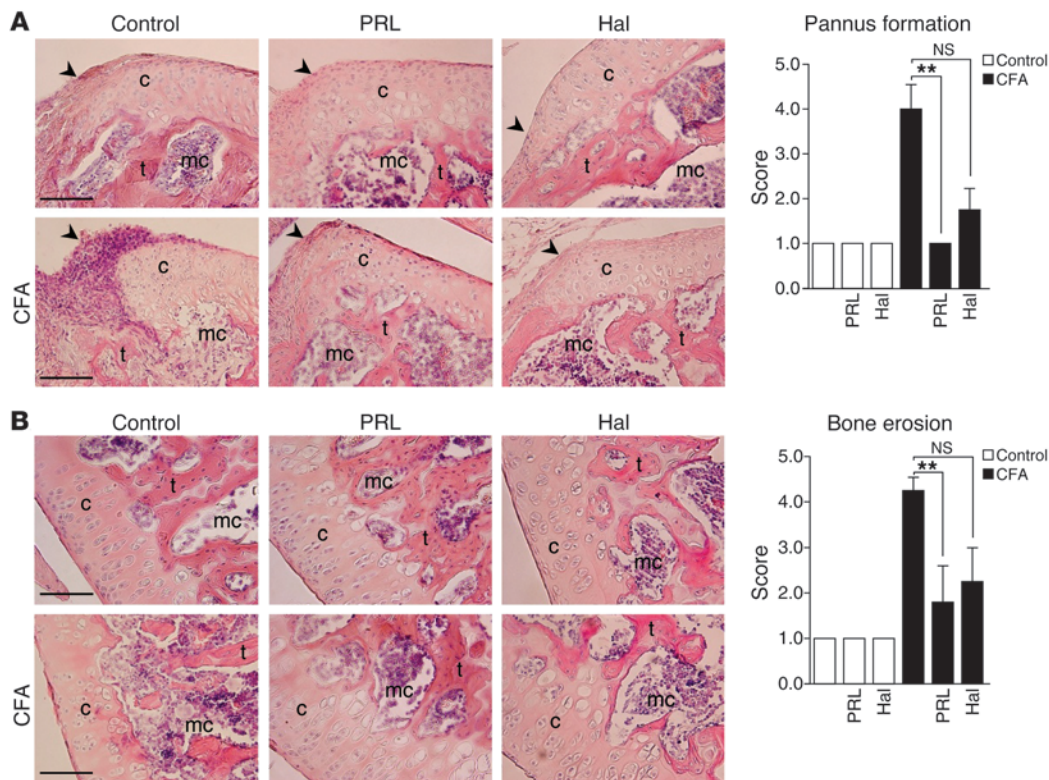
PRL and Hal prevent joint inflammation in adjuvant-induced arthritis. **(A)** Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing Hal were implanted 3 days before the injection of CFA in rats. **(B)** Representative photographs of hind paws from groups infused with PRL or treated with Hal under control and CFA-injected conditions. **(C and F)** Time course of ankle circumference in groups infused with PRL ($n = 10$) or treated with Hal ($n = 16$) under control and CFA-injected conditions. **(C)** Days 15, 18, and 21, $P < 0.001$, CFA vs. control. Days 18 and 21, $P < 0.001$, PRL vs. PRL plus CFA. **(F)** Days 15 and 18, $P < 0.001$, CFA vs. control. Days 12, 15, 18, and 21, $P < 0.001$, CFA vs. Hal plus CFA. **(D and G)** Nociceptive threshold in groups infused with PRL ($n = 5-9$) or treated with Hal ($n = 5-9$). **(E and H)** qRT-PCR-based quantification of *Il1g*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa* mRNA levels in ankle joints from rats treated with PRL ($n = 3-10$) or with Hal ($n = 3-10$) under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Bars are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

and disease activity has been inconsistent (58–62). Generalizations are confounded by the contribution of PRL synthesized locally by cells like chondrocytes (12), synoviocytes and immune cells (16), and endothelial cells (63), which can potentiate the action of systemic PRL. Moreover, PRL has the ability to exert immunostimulatory or immunosuppressive effects, depending on its level and the pathophysiological conditions (17). For example, physiological concentrations of PRL ($<0.02 \mu\text{g/ml}$) are more effective than high PRL levels ($0.1 \mu\text{g/ml}$) in stimulating antibody production by SLE lymphocytes (64), low PRL levels stimulate and high levels inhibit NK cell proliferation (65), and hyperprolactinemic patients (mean serum PRL of $0.98 \mu\text{g/ml}$ or $0.20 \mu\text{g/ml}$) show reduced NK

cell numbers (66) and function (67). Also, hyperprolactinemia protects against inflammatory arthritis in rats (present study), and treatment with a high, but not a low, dose of PRL exacerbates experimental MS (61). In the latter, however, the low dose of PRL is beneficial when combined with IFN- β , and *Prhr*^{-/-} mice display a significantly worse outcome than wild-type mice (61). The variability of the relationship between PRL and autoimmune diseases is further highlighted under physiological hyperprolactinemia. During pregnancy, when PRL levels are high, SLE flare-ups occur, but RA and MS go into remission (59, 68). Breastfeeding, a stimulus elevating circulating PRL, exacerbates SLE in humans (69), but it is protective in the B/W mouse model of SLE (70). Breastfeeding also



research article

**Figure 8**

PRL reduces pannus formation and bone erosion in adjuvant-induced arthritis. Histological evaluation of (A) pannus formation and (B) bone erosion in sections of knee joints stained by hematoxylin and eosin from nonimplanted rats (control) or rats implanted with osmotic minipumps delivering PRL or with subcutaneous tablets releasing Hal 3 days before injecting or not injecting CFA; the histological evaluation was carried out on day 21 after CFA ($n = 3-8$). Pannus-associated regions in each group are indicated (arrows). c, cartilage; t, bone trabeculae; mc, bone marrow cavity. Scale bar: 100 μm . Graphs show histological scores for (A) pannus formation (synovial membrane hyperplasia and infiltration of leukocytes) and (B) bone erosion (thinning and destruction of bone trabeculae). Values are mean \pm SEM. $**P < 0.01$.

worsens RA (71) but protects against postpartum MS relapse (72). These contrasting observations indicate that PRL exerts opposing influences on immune function that depend on complex immune and hormonal interactions.

Although the role of endogenous PRL in autoimmune diseases has generated controversies (57-62, 73), our study reveals that elevating serum PRL levels significantly attenuates cartilage death and joint inflammation in inflammatory arthritis. This strategy may be comparable to the well-established use of glucocorticoids in patients with RA, in which levels of the endogenous hormones appear insufficient to control the disease (74). While PRL is not essential for normal immune system development and function (75, 76), it is a major stress-related hormone (77), balancing immune system homeostasis in the context of stress, trauma, and inflammation (17, 78). Studies clarifying how circulating and local PRL levels are being regulated in the proinflammatory milieu of pathological situations will help establish appropriate PRL levels for controlling ongoing inflammation and the better use of PRL for therapeutic purposes in RA and other inflammatory-related disorders.

Methods

Reagents. Recombinant human TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ were purchased from R&D Systems. Rat PRL and rat PRL radioimmunoassay reagents were obtained from A.F. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Los

Angeles, California, USA). Ovine PRL and L-NAME were purchased from Sigma-Aldrich, and the STAT-3 inhibitor S31-201 and anti-BAX (Sc-493) and anti-BCL-2 (Sc-492) antibodies from Santa Cruz Biotechnology Inc. Antibodies anti-caspase-3 (9662) and anti-pJAK2 (Tyr1007/1008, 3771) were from Cell Signaling Technology Inc., anti-iNOS (06-573) was from Upstate, and CFA was from Difco.

Animals. Male Lewis and Sprague-Dawley rats (200-250 g), Wistar rats (130-150 g), and *Prhr*^{-/-} mice (6-8 months, 129Sv/J background) were housed under standard laboratory conditions (22°C; 12-hour/12-hour light/dark cycle, free access to food and water). Animals were anesthetized with 70% ketamine and 30% xylazine (1 $\mu\text{l/g}$ body weight, i.p.) for surgeries and intra-articular injections, and all procedures were performed between 9:00 and 12:00 AM. To avoid stress-induced alterations, animals were handled daily for 7 days before euthanization by carbon dioxide inhalation and decapitation.

Chondrocyte culture. Articular chondrocytes were isolated from femoral epiphyseal cartilage of male Wistar rats as described previously (12). Cells were seeded at 2×10^5 cells per cm^2 and incubated in DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C for 24 hours. Nonadherent cells were removed, and adherent cells were incubated for 24 hours in either fresh medium or medium containing Cyt (25 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β , and 10 ng/ml IFN- γ) combined or not with different concentrations of rat PRL or the NOS inhibitor L-NAME (1 mM). Other cell cultures were incubated with 100 nM of the STAT3 inhibitor, S31-201. All

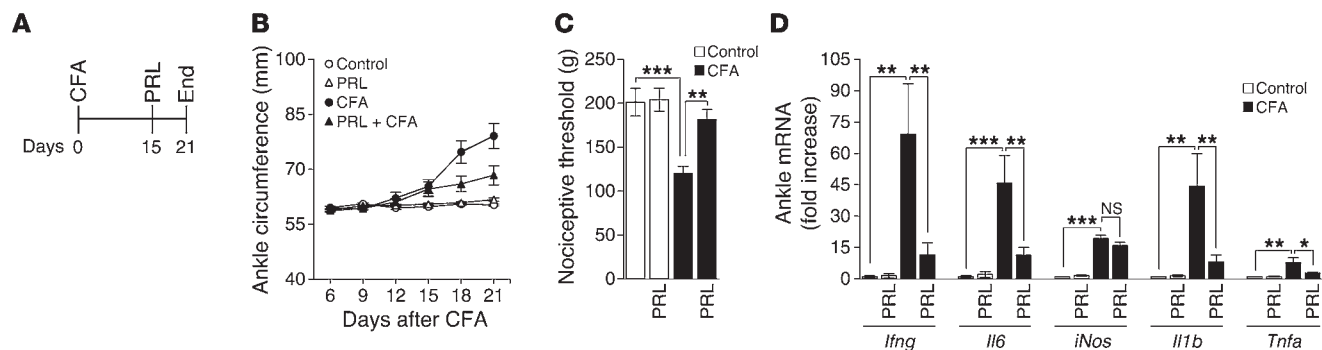


Figure 9

PRL reduces joint inflammation in already arthritic rats. **(A)** Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL were placed 15 days after the injection of CFA in rats, and the experiment ended on day 21 after CFA. **(B)** Time course of ankle circumference ($n = 10\text{--}15$) (days 18 and 21, $P < 0.001$, CFA vs. control), **(C)** evaluation of ankle joint nociceptive threshold ($n = 5\text{--}8$), and **(D)** qRT-PCR–based quantification of *Ifng*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa* mRNA levels ($n = 5\text{--}8$) in ankle joints under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Bars are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

experiments were performed in the first passage of culture. Both detached and adherent chondrocytes were assayed for apoptosis by measuring fragmented nucleosomal DNA using the Cell Death Detection ELISA Kit (Roche Diagnostics). To investigate PRL-induced nuclear translocation of STAT3, chondrocytes were seeded on glass coverslips and treated with or without Cyt in the presence or absence of PRL for 1 hour. Cells were then fixed in 4% PFA at room temperature (RT) for 1 hour, washed, incubated 1 hour at RT with 5% normal goat serum in 0.05% Triton-PBS, and then incubated overnight at 4°C with a 1:100 dilution of anti-total STAT3. Cells were then washed and incubated at RT with the second antibody, Alexa Fluor 546 (1:500; Invitrogen), for 2 hours, and their nuclei were counterstained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich).

Western blot. Chondrocytes incubated with or without Cyt in the absence or presence of PRL were analyzed for JAK2 phosphorylation after 30 minutes, for BAX and BCL-2 after 4 hours, and for total caspase-3 (procaspase-3 and active caspase-3) and iNOS after 6 hours of treatment. Cells were resuspended in lysis buffer (0.5% Igepal, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, pH 7.0) and subjected to SDS/PAGE, and total protein (40 μg) was blotted and probed overnight with a 1:1,000 dilution of anti-caspase-3, anti-iNOS, or anti-pJAK2; a 1:300 dilution of anti-BAX; or a 1:200 dilution of anti-BCL-2. Secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) were used. Densitometric analysis was performed using the Quantity One 1-D image analysis software (Bio-Rad Laboratories Inc.).

The Griess colorimetric assay was used to measure the NO_2^- and NO_3^- concentrations in conditioned media of chondrocytes treated or not with Cyt with or without PRL for 24 hours.

Intra-articular injection of Cyt. Lewis rats and *Prlr*^{-/-} mice were injected in the articular space of right knee joints with Cyt in a final volume of 60 μl (375 ng TNF- α , 150 ng IL-1 β , and 150 ng IFN- γ) and 10 μl (62.5 ng TNF- α , 25 ng IL-1 β , and 25 ng IFN- γ), respectively. A group of rats was coinjected with the Cyt and 8 μg rat PRL. As the estimated volume of rat synovial fluid is 130 μl , the intra-articular concentration of PRL was 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Thirteen days before Cyt injection, other groups of rats were implanted with 2 AP grafts under the kidney capsule in order to induce hyperprolactinemia (23), and half of them were injected i.p. with 1.25 mg/d of CB154 (Parlodel, Novartis), starting 5 days before Cyt injection. Endotoxin-free water (60 μl and 10 μl for rats and mice, respectively) was used as a control vehicle. Forty-eight hours after vehicle or Cyt injection, animals were euthanized to evaluate apoptosis in knee cartilage and assess serum PRL levels by radioimmunoassay.

Adjuvant-induced arthritis. Sprague-Dawley rats were immunized intradermally at the base of the tail with 0.2 ml CFA (10 mg heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra per 1 ml of Freund's adjuvant). Three days before CFA injection, some rats were rendered hyperprolactinemic by the subcutaneous implantation of a 28-day Alzet osmotic minipump (Alza) containing 1.6 mg ovine PRL or a tablet releasing 35 mg Hal over the 60 days of treatment (Innovative Research of America). Other rats were implanted 15 days after CFA injection with 14-day Alzet osmotic minipumps containing 0.8 mg ovine PRL. Arthritis development was evaluated every 3 days by the hind ankle circumference determined by measuring 2 perpendicular diameters, the laterolateral diameter (a) and the anteroposterior diameter (b), with a digital caliper and using the following formula: circumference = $2\pi(\sqrt{(a^2+b^2)}/2)$. On day 21 after CFA, hind paw pain was assessed using an Analgesy-Meter (Ugo Basile S.R.L.), and knee joints and hind paws were dissected to evaluate in situ apoptosis and expression of proapoptotic and proinflammatory markers, respectively. In addition, adjuvant-induced arthritis was evaluated histologically. Knee joints were fixed, decalcified, and dehydrated for paraffin embedding. Knee sections (7 μm) stained by hematoxylin and eosin were scored as reported previously (79), with the following modifications: 1 (no detectable change), 2 (slight change), 3 (moderate change), 4 (remarkable change), and 5 (severe change) for pannus formation (synovial membrane hyperplasia and infiltration of leukocytes) and bone erosion (thinning and destruction of bone trabeculae). Histological parameters were scored by 4 single-blind, independent observers (N. Adán, M.G. Ledesma-Colunga, S. Thebault, and C. Clapp).

In situ apoptosis. Seven- μm knee sections were deparaffinized, rehydrated, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate for 7 minutes followed by incubation in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, pH 6.0) for 1 minute at 86°C. Apoptosis was detected by the TUNEL method using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) and by immunohistochemistry using a polyclonal antibody against active caspase-3 (1:25; Millipore) and Alexa Fluor 546 secondary antibody (1:500) as well as by staining the condensed/fragmented DNA with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich). Apoptotic signals were visualized under fluorescence microscopy (Microscope BX60F5, Olympus Optical Co. LTD) and quantified by the image analysis system software Pro-Plus (Media Cybernetics Inc.).

qRT-PCR. Frozen whole ankle joints were pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total RNA was isolated using TRIZOL reagent (Invitrogen) and reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse



research article

Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR products were detected and quantified with Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) in a 10 µl final reaction volume containing template and 0.5 µM of each of the primer pairs for *Casp3*, forward 5'-GAAAGCCGAACTTTCATCA-3', reverse 5'-ATAGTAACCGGGTGC GGAT-3'; *Bax*, forward 5'-ACTGGA-CAACAACATGGTGC-3', reverse 5'-ATCAGCTCGGGCACTTTAGT-3'; *p53*, forward 5'-AGAGACCCAGCAACTACCAACA-3', reverse 5'-CTCA-GACTGACAGCCTCTGCAT-3'; *Ifng*, forward 5'-AGCACAAAGCT-GTCAATGAA-3', reverse 5'-TTCTTCTTATTGGGCACATC-3'; *Il6*, forward 5'-TCCAACACTCTTGAAGCA-3', reverse 5'-TTCATATTGC-CAGTTCTTCG-3'; *Tnfa*, forward 5'-GGGCTTGCTACTCGAGTTTT-3', reverse 5'-TGCTCAGCCTTCTCATT-3'; *iNos*, forward 5'-TTTTAGA-GACGCTTCTGAGG-3', reverse 5'-GTCCTTTTCTCTTTCAGGT-3'; *Il1b*, forward 5'-AAAAGCGGTTTGTCTTCAAC-3', reverse 5'-GGAATA-GTGCAGCCATCTTT-3'; and *Ubc*, forward 5'-CTGACAGGGTGC GG-CATCTT-3', reverse 5'-ACTGCAGCCAACACCGCTGAC-3'. Amplification performed in the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) included a denaturation step of 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of amplification (10 seconds at 95°C, 30 seconds at the primer pair-specific annealing temperature, and 30 seconds at 72°C). The PCR data were analyzed by the 2^{-ΔΔCT} method, and cycle thresholds normalized to the housekeeping gene *Ubc* were used to calculate the mRNA levels of interest.

Serum PRL. Rat PRL was measured in serum by conventional radioimmunoassay, and infused ovine PRL was measured by the Nb2 cell bioassay, a standard procedure based on the proliferative response of the Nb2 lymphoma cells to PRL, carried out as described previously (80).

Statistics. All data were replicated in 3 or more independent experiments. The statistical analyses were performed using the Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc.) and the GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) software. Data distribution and equality of variances were determined by D'Agostino-Pearson omnibus and Levene's tests. In case of data

with normal distribution and/or equal variances, statistical differences between 2 and more than 3 groups were determined by 2-tailed Student's *t* test and 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparison test, respectively. In case of data with nonparametric distribution, statistical differences between 2 and more than 3 groups were determined by Mann Whitney's and Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc comparison tests, respectively. The threshold for significance was set at *P* < 0.05.

Study approval. All experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico and comply with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, DC, USA).

Acknowledgments

The authors thank Gabriel Nava, Martín García, Daniel Mondragón, and Antonio Prado for excellent technical assistance as well as Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript. N. Adán, J. Guzmán-Morales, S.I. Perales-Canales, and M.G. Ledesma-Colunga were supported by fellowships from the Council of Science and Technology of Mexico and the PhD Program in Biomedical Sciences of the National University of Mexico (UNAM). The study was supported by UNAM grants IN200509 and IN200312 to C. Clapp.

Received for publication February 21, 2013, and accepted in revised form June 6, 2013.

Address correspondence to: Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Querétaro, México. Phone: 52.442.238.1028; Fax: 52.442.238.1005; E-mail: clapp@unam.mx.

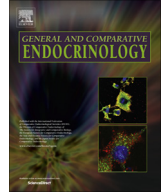
1. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(6):429-442.
2. Schuerwegh AJ, et al. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(9):681-687.
3. Goggs R, et al. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J.* 2003; 166(2):140-158.
4. Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2006;6(1):13-19.
5. Keffer J, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991;10(13):4025-4031.
6. Polzer K, Schett G, Zwerina J. The lonely death: chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis. *Autoimmunity.* 2007;40(4):333-336.
7. Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(7):1528-1537.
8. Yatsugi N, et al. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci.* 2000;5(2):150-156.
9. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 suppl):S108-S115.
10. Lo MY, Kim HT. Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1. *J Orthop Res.* 2004;22(1):140-144.
11. Andreas K, et al. Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R9.
12. Macotella Y, et al. Matrix metalloproteases from

- chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci.* 2006;119(pt 9):1790-1800.
13. Zermeno C, et al. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol.* 2006;189(2):R1-R8.
14. Ogueta S, et al. 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.* 2002;190(1-2):51-63.
15. Rovensky J, et al. Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23(3):292-296.
16. Nagafuchi H, et al. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1999;26(9):1890-1900.
17. Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:435-455.
18. Wu GJ, et al. Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1520-1531.
19. Teixeira CC, et al. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(3):C833-C839.
20. DaSilva L, et al. Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;117(2):131-140.
21. Suemoto H, et al. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol.* 2007;312(2):572-581.
22. Siddiquee K, et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc*

- Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7391-7396.
23. Adler RA. The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev.* 1986;7(3):302-313.
24. Schuff KG, et al. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest.* 2002; 110(7):973-981.
25. Kapur S, et al. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2000;157(4):514-520.
26. Cai X, et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006; 373(2):140-147.
27. Neidhart M, Fluckiger EW. Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology.* 1992;77(3):449-455.
28. Grimaldi MG. Long-term low dose haloperidol treatment in rheumatoid patients: effects on serum sulphhydryl levels, technetium index, ESR, and clinical response. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12(4):579-581.
29. Moots RJ, et al. Old drug, new tricks: haloperidol inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(9):585-587.
30. Aigner T, et al. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):128-149.
31. Adams CS, Horton WE Jr. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec.* 1998;250(4):418-425.
32. Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(12):959-965.



33. Cho TJ, et al. Tumor necrosis factor alpha activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum.* 2003;48(10):2845–2854.
34. Westacott CI, et al. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(9):676–681.
35. Schlaak JF, et al. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(2):155–162.
36. Rohner E, et al. Inflammatory synovial fluid microenvironment drives primary human chondrocytes to actively take part in inflammatory joint diseases. *Immunol Res.* 2012;52(3):169–175.
37. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* 2008;29(1):1–41.
38. Corbacho AM, et al. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 2003;544(1–3):171–175.
39. Hunter S, Koch BL, Anderson SM. Phosphorylation of cbl after stimulation of Nb2 cells with prolactin and its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol.* 1997;11(9):1213–1222.
40. al-Sakkaf KA, Dobson PR, Brown BL. Prolactin induced tyrosine phosphorylation of p59fyn may mediate phosphatidylinositol 3-kinase activation in Nb2 cells. *J Mol Endocrinol.* 1997;19(3):347–350.
41. Bailey JP, et al. Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway. *Mol Endocrinol.* 2004;18(5):1171–1184.
42. Tessier C, et al. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology.* 2001;142(9):4086–4094.
43. Price J, et al. Akt-1 mediates survival of chondrocytes from endoplasmic reticulum-induced stress. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):502–508.
44. Chen Q, et al. Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase C α in chondrocytes. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012;50(1):137–143.
45. van Beuningen HM, Arntz OJ, van den Berg WB. In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum.* 1991;34(5):606–615.
46. Hauselmann HJ, et al. The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):478–488.
47. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998;10(3):263–268.
48. Hashimoto S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(9):1632–1638.
49. Leiderman S, et al. Prolactin and IgG-prolactin complex levels in patients with rheumatic arthritis. *Ann NY Acad Sci.* 2002;966:252–257.
50. Clement-Lacroix P, et al. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology.* 1999;140(1):96–105.
51. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(4):377–385.
52. Spears R, et al. Tumor necrosis factor-alpha and apoptosis in the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2003;48(12):825–834.
53. Gonzalez C, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw.* 2007;18(3):127–135.
54. Song C, et al. Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist. *Schizophr Res.* 2000;42(2):157–164.
55. Resman-Targoff BH, Cicero MP. Aggressive treatment of early rheumatoid arthritis: recognizing the window of opportunity and treating to target goals. *Am J Manag Care.* 2010;16(9 suppl):S249–S258.
56. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 1999;283(5406):1277–1278.
57. Neidhart M, Gay RE, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(5–6):218–222.
58. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007;6(8):537–542.
59. Jara LJ, et al. Prolactin and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40(1):50–59.
60. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6–7):A465–A470.
61. Zhornitsky S, et al. Prolactin in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(1):15–23.
62. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 2007;78(suppl 1):255–261.
63. Corbacho AM, et al. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol.* 2000;166(1):53–62.
64. Jacobi AM, et al. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(3):242–247.
65. Matera L, et al. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun.* 1992;6(4):409–417.
66. Gerli R, et al. Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clin Exp Immunol.* 1986;64(2):399–406.
67. Vidaller A, et al. Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient. *J Clin Immunol.* 1992;12(3):210–215.
68. Vukusic S, et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMIS study): clinical predictors of postpartum relapse. *Brain.* 2004;127(pt 6):1353–1360.
69. Mok CC, Wong RW, Lau CS. Exacerbation of systemic lupus erythematosus by breast feeding. *Lupus.* 1998;7(8):569–570.
70. McMurray RW, et al. Effects of parturition, suckling and pseudopregnancy on variables of disease activity in the B/W mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1993;20(7):1143–1151.
71. Barrett JH, et al. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1010–1015.
72. Langer-Gould A, et al. Exclusive breastfeeding and the risk of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009;66(8):958–963.
73. McMurray RW. Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;31(1):21–32.
74. Hardy RS, Raza K, Cooper MS. Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13650.
75. Horseman ND, et al. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 1997;16(23):6926–6935.
76. Bouchard B, et al. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol.* 1999;163(2):576–582.
77. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 1990;46(20):1407–1420.
78. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):292–312.
79. Hamada T, et al. Suppression of adjuvant arthritis of rats by a novel matrix metalloproteinase-inhibitor. *Br J Pharmacol.* 2000;131(8):1513–1520.
80. Tanaka T, et al. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51(5):1058–1063.



Review

Arthritis and prolactin: A phylogenetic viewpoint



Norma Adán¹, María G. Ledesma-Colunga¹, Ana L. Reyes-López, Gonzalo Martínez de la Escalera, Carmen Clapp*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 4 February 2014

Keywords:

Inflammation
Stress
Reproduction
Spondyloarthritis
Osteoarthritis
Rheumatoid arthritis

ABSTRACT

Arthritic disorders are family of diseases that have existed since vertebrate life began. Their etiology is multifactorial with genetic, environmental, and gender factors driving chronic joint inflammation. Prolactin is a sexually dimorphic hormone in mammals that can act to both promote and ameliorate rheumatic diseases. It is found in all vertebrate groups where it exerts a wide diversity of actions. This review briefly addresses the presence and features of arthritic diseases in vertebrates, the effects of PRL on joint tissues and immune cells, and whether PRL actions could have contributed to the ubiquity of arthritis in nature. This comparative approach highlights the value of PRL as a biologically conserved factor influencing the development and progression of arthritis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The joint is made of cartilage, bone, tendon, and muscle and is essential for mechanical support and mobility. The articular joint functions to transmit force from one bone to another with the cartilage providing a resistant, elastic, and smooth surface distributing load while allowing movement. Joint inflammation (arthritis) causes pain, swelling, and dysfunction, and it is a major cause of impaired movement and disability. Attesting to the influence of the terrestrial environment, arthritis has never been reported in fish, but various forms of arthritis have been documented in contemporary amphibians, reptiles, birds, and mammals and in their ancestral past. Cases of arthritis have been identified in fossil records of Triassic dinosaurs (Cisneros et al., 2010), Pleistocene mammals (Rothschild et al., 2013, 2001b), and thousands of years ago in neolithic man (Rothschild et al., 1988), indicating that inflammatory arthropathies are ancient diseases. Because in humans the age of onset of many of the most common inflammatory arthritides is in the twenties (Braun and Sieper, 2007; Warrell et al., 2010), these diseases were likely to be experienced well before reproductive senescence, and natural selection should have had the opportunity to select against them. However, in spite of evolutionary pressures, inflammatory arthritides stand as prevalent disorders across taxa. A plausible explanation for this inconsistency proposes that the painful and limiting characteristics of arthritis represent a

thrifty adaptation selected to compel organisms to slow down and refrain from physically demanding activities in order to minimize voluntary energy expenditure (Reser and Reser, 2010). Such a strategy would be particularly relevant for vertebrates experiencing adversity hardship such as the starving, the stressed, the pregnant or lactating, and the elderly. The close association between arthritis, stress, gender, and reproductive states (Golding et al., 2007; Huyser and Parker, 1998; van Vollenhoven, 2009; Warrell et al., 2010) points to a contribution of chemical mediators that are upregulated in these conditions. One such mediator is prolactin (PRL), a stress-related (Gala, 1990; Reichlin, 1988) and reproductive hormone that is essential for lactation in mammals and controls a wide variety of other actions (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998) including effects on joint tissues and immune cells. PRL regulates cartilage survival (Adan et al., 2013), bone development and growth (Clement-Lacroix et al., 1999), and the proliferation, apoptosis, and release of proinflammatory mediators by immune cells (Yu-Lee, 2002), and it can both promote and mitigate rheumatic diseases (Adan et al., 2013). In this review we briefly summarize known and speculative issues underlying the presence of arthritis in different vertebrate groups and discuss the possibility that PRL regulation of joint tissues and inflammation early in vertebrate phylogeny could have influenced arthritis development and progression.

2. Inflammatory arthritides: features and etiology

Inflammatory arthritides define a group of acute and chronic arthritic conditions that involve the articular joints, the spine, and

* Corresponding author. Fax: +52 442 238 1005.

E-mail address: clapp@unam.mx (C. Clapp).

¹ Contributed equally to this work.

other organ systems. In humans, they include rheumatoid arthritis, spondyloarthritis (comprising different diseases: ankylosing spondylitis, reactive arthritis, psoriatic arthritis, arthritis conditions associated with inflammatory bowel disease), septic arthritis, and gout. Osteoarthritis may also be included as it has an inflammatory component in its advanced stages (Berenbaum, 2013). The clinical features differ among these diseases and can include deforming and destructive monoarthritis or polyarthritis (symmetric or asymmetric), cartilage degradation, bone erosion or overgrowth, synovial hyperplasia, and various degrees of extra-articular manifestations (subcutaneous nodule formation, uveitis, skin rash, vasculitis, serositis, amyloidosis, fibrosing alveolitis), systemic features of inflammation (fatigue, anaemia, weight loss), and comorbidities (cardiovascular disease, infections, and B-cell lymphomas) (Dougados and Baeten, 2011; Scott et al., 2010; Warrell et al., 2010).

The etiology is known for gout (monosodium urate crystals inducing inflammation and joint destruction) and septic arthritis (infection of a joint by Gram-positive or negative pathogens, viruses, mycobacteria, and fungi), but it remains unclear for spondyloarthritis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. The latter three are multifactorial, with genetic factors (such as mutations in human leukocyte antigens and type 2 procollagen genes), environmental conditions (infectious agents, diet, physical activity, trauma) and host aspects (body size, metabolism, age, gender, reproductive state) playing a role (Dougados and Baeten, 2011; Haseeb and Haqqi, 2013; Scott et al., 2010; Sharkey et al., 2007; Warrell et al., 2010). In spondyloarthritis and rheumatoid arthritis, a complex interaction among the various contributing factors and an unidentified trigger initiates a biological response that results in the recruitment of immune cells into the joints and other sites of disease. Autoimmunity and inflammatory reactions then lead to structural joint damage and failure. In osteoarthritis, increased catabolic reactions result in cartilage damage and loss, local production of proinflammatory cytokines, and reactive bone formation (Dougados and Baeten, 2011; Berenbaum, 2013).

3. Arthritis in vertebrates

Spondyloarthritis is the most common form of arthritis in vertebrates (Rothschild, 2010; Rothschild et al., 2001b). Cases have been reported in amphibians (toads) (Brown et al., 2007), reptiles (lizards and crocodylians) (Rothschild, 2010), non-passerine birds (Rothschild and Panza, 2005), and mammals (primates, cetaceans, rhinoceros, bears, canids, and felids) (Kolmstetter et al., 2000; Kompanje, 1999; Nunn et al., 2007; Rothschild, 2005, 2001a, b). Gout and osteoarthritis have also been reported in the various vertebrates, but are rare in the wild and increase under captivity (Degernes et al., 2011; Greer et al., 2003; Rothschild, 2003, 2010; Warrell et al., 2010; Wobeser and Runge, 1975). In contrast, rheumatoid arthritis is limited to humans (Firestein, 2009), where it was first identified 5000 years ago (Rothschild, 2001) and is reported to have originated from the parent disease spondyloarthritis (Klepinger, 1978).

Prolonged locomotion and larger body size have been proposed as causative links for arthritis in vertebrates (Brown et al., 2007; Nunn et al., 2007), and joint infections increase with body size. The association of spondyloarthritis with pathogens (Dougados and Baeten, 2011; Rothschild, 2005; Shilton et al., 2008) suggests that molecular mimicry shared between micro-organisms and self antigens could help trigger an autoimmune response in susceptible individuals (Dougados and Baeten, 2011; Nunn et al., 2007). Moreover, sustained locomotion, infection, and other life-threatening scenarios (trauma, prolonged starvation, etc.) create high levels of stress, an internal condition that can precede and modify arthri-

tis progression, given the ability of stress hormones to dampen or enhance immune function (Martin, 2009; McCray and Agarwal, 2011).

Other host factors influencing arthritis are age and gender. Spondyloarthritis and rheumatoid arthritis have a young adult onset (Dougados and Baeten, 2011; Warrell et al., 2010), whereas the incidence of osteoarthritis and gout rise with age (Haseeb and Haqqi, 2013; Saag and Choi, 2006; Warrell et al., 2010). Spondyloarthritis has no apparent gender specificity in non-human vertebrates (Rothschild et al., 2001a), albeit ankylosing spondylitis occurs preferentially in men (Dougados and Baeten, 2011), and rheumatoid arthritis and osteoarthritis are more frequent in women (Haseeb and Haqqi, 2013; Scott et al., 2010; Warrell et al., 2010). Gender correlations point to the influence of reproductive hormones in human arthritis, a conclusion supported by the amelioration of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis during pregnancy (Da Silva and Spector, 1992; Ostensen, 1992), and the exacerbation of rheumatoid arthritis in lactation (Barrett et al., 2000) and at menopause (Kuiper et al., 2001). A similar influence of pregnancy and lactation has been reported in rodents with induced inflammatory arthritis (Ratkay et al., 2000; Waites and Whyte, 1987), but to our knowledge there is no information concerning the influence of these reproductive states on arthritis development in wild non-mammalian and mammalian species, respectively.

PRL is a sexually dimorphic hormone in mammals that could play a role in arthritis development. Its levels are higher in mammalian females than in males, and pregnancy and lactation are states of physiological hyperprolactinemia (Ben-Jonathan et al., 2008). A number of physical and emotional forms of stress stimulate the secretion of pituitary PRL into the circulation (Gala, 1990; Reichlin, 1988), which may be an adaptation to ensure competence of the immune system (Dorshkind and Horseman, 2001; Yu-Lee, 2002), and proper physiological and behavioral responses to stress (Torner et al., 2001). Importantly, PRL promotes the growth and survival of joint tissues and protects against joint damage and inflammation in inflammatory arthritis (Adán et al., 2013).

4. PRL and arthritis

The PRL receptor is expressed in murine and human joint tissues including cartilage chondrocytes (Zermeno et al., 2006), osteoblasts (Clement-Lacroix et al., 1999), synovial cells (Nagafuchi et al., 1999), and immune cells (Yu-Lee, 2002). The human synovial fluid contains PRL (Ogueta et al., 2002) that may derive from the circulation or may be produced locally, since synovial cells (Nagafuchi et al., 1999), chondrocytes (Zermeno et al., 2006), immune cells (Montgomery, 2001), and endothelial cells (Corbacho et al., 2000) express PRL. In growing rats, treatment with PRL increases bone formation (Krishnamra and Seemoung, 1996), which slows down during embryonic development in the absence of the PRL receptor (Clement-Lacroix et al., 1999). However, targeted disruption of the PRL receptor has no articular cartilage phenotype (Adán et al., 2013), unless animals are subjected to an inflammatory challenge. Proinflammatory cytokines (cyt), including tumor necrosis factor α , interleukin 1β , and interferon γ , are major inflammatory mediators that destroy articular cartilage by inducing chondrocyte apoptosis and releasing matrix-degrading proteases (McInnes and Schett, 2007). Stimulation of chondrocyte apoptosis following the intraarticular injection of cyt is enhanced in PRL receptor null mice and reduced after inducing hyperprolactinemia in rats (Adán et al., 2013). Also, treatment with PRL inhibits the cyt-induced apoptosis of cultured chondrocytes by preventing the induction of p53 and decreasing the BAX/BCL-2 ratio through a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway (Adán et al.,

2013). Finally, eliciting hyperprolactinemia in the rat adjuvant model of inflammatory arthritis reduces chondrocyte apoptosis, proinflammatory cytokine expression, pannus formation, bone erosion, joint swelling, and pain (Adán et al., 2013). Therefore, high levels of circulating PRL protect against permanent joint damage and inflammation in experimental arthritis.

Nevertheless, the above findings are in contrast with clinical studies showing that PRL may exacerbate rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, celiac disease, multiple sclerosis) (Chuang and Molitch, 2007; Jara et al., 2011; Orbach and Shoenfeld, 2007; Shelly et al., 2012). Evidence for this pathogenic action is largely circumstantial: the preponderance of these diseases in women, the higher levels of circulating PRL found in some patients, the therapeutic value of blocking PRL release with dopamine agonists, and the immunoenhancing properties of PRL (Chuang and Molitch, 2007; Jara et al., 2011; Orbach and Shoenfeld, 2007; Shelly et al., 2012). However, treatment with a dopamine agonist is not always effective, and the association between PRL levels and disease activity is inconsistent (Chuang and Molitch, 2007; Jara et al., 2011; Orbach and Shoenfeld, 2007; Shelly et al., 2012). Conclusions are confounded by locally produced PRL able to potentiate the actions of the systemic hormone, and by the ability of PRL to both stimulate or inhibit the immune system, depending on its level and the pathophysiological condition. Under stress conditions, higher levels of circulating PRL can be anti-inflammatory (Dugan et al., 2002; Oberbeck et al., 2003; Vidaller et al., 1992), whereas lower PRL levels, such as those in the non-stressed animal, are pro-inflammatory (Jacobi et al., 2001; Matera et al., 1992). When combined with interferon β , a low dose of PRL reduces inflammation in experimental multiple sclerosis and PRL receptor null mice display a significantly worse outcome than wild type mice (Zhornitsky et al., 2013). During pregnancy, when PRL levels are high, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis go into remission (Langer-Gould and Beaber, 2013; Ostensen and Villiger, 2007) but systemic lupus erythematosus flares up (Jara et al., 2011). Also, breastfeeding, a stimulus that elevates circulating levels of PRL, exacerbates rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (Barrett et al., 2000; Mok et al., 1998), but reduces the risk of rheumatoid arthritis (Karlson et al., 2004) and protects

against multiple sclerosis relapse (Langer-Gould et al., 2009). These observations indicate the ability of PRL to influence immune system homeostasis in the context of stress, inflammation, and reproduction, and support the possibility that PRL affects the development and progression of arthritis and other rheumatic diseases in mammals (Fig. 1).

5. Does PRL influence arthritis prevalence in non-mammalian vertebrates?

PRL is a multifunctional hormone with an ancient past. It is found in invertebrates (Hull et al., 1998; Quintanar et al., 2007) and thought to have evolved 400–800 million years ago to regulate water and electrolyte balance, growth and development, reproduction, endocrinology and metabolism, brain and behavior, the immune system, and angiogenesis in the various vertebrate groups (Bole-Feysot et al., 1998; Clapp et al., 2012). PRL gene sequences have been identified in all bony fish and tetrapods analyzed, they exhibit significant divergence, and their evolution may be branched into two lineages, the tetrapod lineage and the teleost lineage (Forsyth and Wallis, 2002; Huang et al., 2009). Recently, a new PRL-like gene was found in cartilaginous fish and in almost all the non-mammalian vertebrate classes but not in mammals (Huang et al., 2009). The protein encoded by this novel gene is homologous to PRL and can transactivate the PRL receptor (Huang et al., 2009).

While it is clear that PRL could play a role in regulating arthritis development in mammals, studies are incomplete or non-existent in non-mammalian species. There is evidence for the presence of PRL receptors in bone, muscle, and immune cells in fish (Manzon, 2002; Whittington and Wilson, 2013) and birds (Bu et al., 2013; Zhou et al., 1996), but no studies have addressed the presence of PRL receptor in other joint tissues of these vertebrates or in the joint tissues and immune cells of amphibians and reptiles. Notably, an energy-demanding condition that may have influenced the prevalence of arthritis in nature is that of providing nutrients to the young, the best-known effect of PRL. PRL promotes milk production in mammals, but also in fish and birds. It stimulates the surface of the skin of parent fish to produce a mucous ("discus milk") that is used to feed the developing young (Whittington

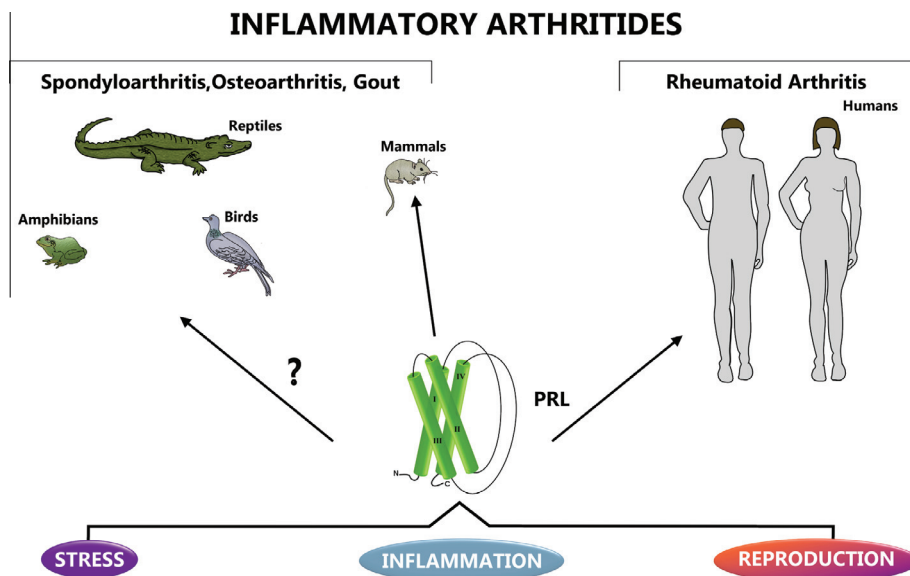


Fig. 1. Schematic representation illustrating the hypothesis that PRL levels influence the development and progression of inflammatory arthritides under conditions of stress, inflammation, and reproduction. Evidence supports these effects of PRL on rheumatoid arthritis in humans and other inflammatory arthritides in mammals, while its role remains speculative in non-mammalian vertebrates.

and Wilson, 2013). Likewise, PRL induces the growth of the mucosal epithelium lining the crop-sac (a pouch in the esophagus of birds) and clumps of cells are then shed into the lumen to feed the squabs as crop milk (Angelier and Chastel, 2009; Clapp et al., 2012). No form of lactation has been reported in contemporary reptiles, but it may have existed in their ancestral past (Else, 2013). Another phylogenetically conserved, reproductive effect of PRL is the stimulation of parental behavior, an action found in fish, birds, and mammals (Angelier and Chastel, 2009; Bole-Feysot et al., 1998; Whittington and Wilson, 2013).

Due to the increased metabolic demand related to feeding and tending the young, wild animals are especially susceptible to aversive situations (deleterious climatic events, starvation, predator attack) during the parental phase of the breeding cycle. Stressors and energetic constraints threaten parental survival, and diverse protective responses to stress have evolved. A well-known effect of stressors on parental birds is the interference with parental behavior, an effect that involves the stress-mediated downregulation of PRL levels (Angelier and Chastel, 2009). In mammals, however, there is an attenuation of neuroendocrine and emotional stress responses during pregnancy and lactation that may be an adaptation that ensures maintenance of parental care although it is detrimental for parent survival (Torner and Neumann, 2002). Such attenuation can be counteracted by inhibiting the expression of PRL receptors in brain (Torner and Neumann, 2002; Torner et al., 2001). Thus, PRL has the ability to modify stress-related events either to the detriment or benefit of parental survival.

It has been proposed that arthritis developed as a survival adaptation for parents to conserve energy in conditions of severe environmental stressful conditions (Reser and Reser, 2010). Although insufficient information exists in non-mammalian species, the facts that reproductive effects of PRL and PRL stress-related interactions are phylogenetically conserved, and that PRL receptors are present in immune, bone, and muscle cells of fish and birds, prompt the speculation that PRL may act on non-mammalian vertebrates as an epigenetic, adaptive regulator of arthritis development, similar to its role in mammals (Fig. 1). Moreover, in these non-mammalian species PRL influence may extend to males and non-breeding females.

6. Concluding remarks

PRL is a regulatory hormone that can mediate stress-immune interactions in arthritic joints under reproductive and non-reproductive conditions. Arthritis and PRL have coexisted for millions of years, in a world populated by fish, amphibians, reptiles, birds, and only a few small mammals. Several functions of PRL have been conserved phylogenetically, including regulation of the stress and immune responses and parental care. The conservation of similar PRL effects throughout evolution reflects their high value and suggests they play a role in health and disease, warranting further investigation.

Acknowledgments

We thank Fernando López-Barrera and Francisco Javier Valles Valenzuela for their technical assistance, Guadalupe Calderón for artistic contribution, and Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript. N. Adán and M.G. Ledesma-Colunga were supported by fellowships from the Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) and the Ph.D. Program in Biomedical Sciences of the National University of Mexico (UNAM). The study was supported by UNAM Grant (IN200312) and CONACYT Grant (161594) to C. Clapp.

References

- Adán, N., Guzman-Morales, J., Ledesma-Colunga, M.G., Perales-Canales, S.I., Quintanar-Stephano, A., Lopez-Barrera, F., Mendez, I., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., Binart, N., Martinez de la Escalera, G., Thebault, S., Clapp, C., 2013. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 123, 3902–3913.
- Angelier, F., Chastel, O., 2009. Stress, prolactin and parental investment in birds: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 142–148.
- Barrett, J.H., Brennan, P., Fiddler, M., Silman, A., 2000. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1010–1015.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., LaPensee, E.W., 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.* 29, 1–41.
- Berenbaum, F., 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage/OARS Osteoarthritis Res. Soc.* 21, 16–21.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edey, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- Braun, J., Sieper, J., 2007. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369, 1379–1390.
- Brown, G.P., Shilton, C., Phillips, B.L., Shine, R., 2007. Invasion, stress, and spinal arthritis in cane toads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 17698–17700.
- Bu, G., Ying Wang, C., Cai, G., Leung, F.C., Xu, M., Wang, H., Huang, G., Li, J., Wang, Y., 2013. Molecular characterization of prolactin receptor (cPRLR) gene in chickens: gene structure, tissue expression, promoter analysis, and its interaction with chicken prolactin (cPRL) and prolactin-like protein (cPRL-L). *Mol. Cell Endocrinol.* 370, 149–162.
- Cisneros, J.C., Gomes Cabral, U., de Beer, F., Damiani, R., Costa Fortier, D., 2010. Spondylarthritis in the triassic. *PLoS One* 5, e13425.
- Clapp, C., Martinez de la Escalera, L., Martinez de la Escalera, G., 2012. Prolactin and blood vessels: a comparative endocrinology perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 336–340.
- Clement-Lacroix, P., Ormandy, C., Lepescheux, L., Ammann, P., Damotte, D., Goffin, V., Bouchard, B., Amling, M., Gaillard-Kelly, M., Binart, N., Baron, R., Kelly, P.A., 1999. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* 140, 96–105.
- Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M.A., Martinez De La Escalera, G., Clapp, C., 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* 166, 53–62.
- Chuang, E., Molitch, M.E., 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 78 (Suppl. 1), 255–261.
- Da Silva, J.A., Spector, T.D., 1992. The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 11, 189–194.
- Degernes, L.A., Lynch, P.S., Shivaprasad, H.L., 2011. Degenerative joint disease in captive waterfowl. *Avian Pathol.* 40, 103–110.
- Dorshkind, K., Horseman, N.D., 2001. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 23, 288–294.
- Dougados, M., Baeten, D., 2011. Spondyloarthritis. *Lancet* 377, 2127–2137.
- Dugan, A.L., Thellin, O., Buckley, D.J., Buckley, A.R., Ogle, C.K., Horseman, N.D., 2002. Effects of prolactin deficiency on myelopoiesis and splenic T lymphocyte proliferation in thermally injured mice. *Endocrinology* 143, 4147–4151.
- Else, P.L., 2013. Dinosaur lactation? *J. Exp. Biol.* 216, 347–351.
- Firestein, G.S., 2009. Rheumatoid arthritis in a mouse? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 5, 1.
- Forsyth, I.A., Wallis, M., 2002. Growth hormone and prolactin—molecular and functional evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 291–312.
- Gala, R.R., 1990. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 46, 1407–1420.
- Golding, A., Haque, U.J., Giles, J.T., 2007. Rheumatoid arthritis and reproduction. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 33, 319–343, vi–vii.
- Greer, L.L., Strandberg, J.D., Whitaker, B.R., 2003. *Mycobacterium chelonae* osteoarthritis in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*). *J. Wildl. Dis.* 39, 736–741.
- Haseeb, A., Haqqi, T.M., 2013. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin. Immunol.* 146, 185–196.
- Huang, X., Hui, M.N., Liu, Y., Yuen, D.S., Zhang, Y., Chan, W.Y., Lin, H.R., Cheng, S.H., Cheng, C.H., 2009. Discovery of a novel prolactin in non-mammalian vertebrates: evolutionary perspectives and its involvement in teleost retina development. *PLoS One* 4, e6163.
- Hull, K.L., Fathimani, K., Sharma, P., Harvey, S., 1998. Calcitropic peptides: neural perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 389–410.
- Huysen, B., Parker, J.C., 1998. Stress and rheumatoid arthritis: an integrative review. *Arthritis Care Res.* 11, 135–145.
- Jacobi, A.M., Rohde, W., Volk, H.D., Dörner, T., Burmester, G.R., Hiepe, F., 2001. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 242–247.
- Jara, L.J., Medina, G., Saavedra, M.A., Vera-Lastra, O., Navarro, C., 2011. Prolactin and autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 40, 50–59.
- Karlson, E., Mandl, L., Hankinson, S., Grodstein, F., 2004. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum.* 50, 3458–3467.

- Klepinger, L.L., 1978. Paleopathologic evidence for the evolution of rheumatoid arthritis. *Am. J. Phys. Anthropol.* 50, 119–122.
- Kolmstetter, C., Munson, L., Ramsay, E.C., 2000. Degenerative spinal disease in large felids. *J. Zoo Wildl. Med.* 31, 15–19.
- Kompanje, E., 1999. Considerations on the comparative pathology of the vertebrae in Mysticeti and Odontoceti; evidence for the occurrence of discarthrosis, zygarthrosis, infectious spondylitis and spondyloarthritis. *Zoologische Mededeelingen* 73, 99–130.
- Krishnamra, N., Seemoung, J., 1996. Effects of acute and long-term administration of prolactin on bone ⁴⁵Ca uptake, calcium deposit, and calcium resorption in weaned, young, and mature rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1157–1165.
- Kuiper, S., van Gestel, A.M., Swinkels, H.L., de Boo, T.M., da Silva, J.A., van Riel, P.L., 2001. Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 28, 1809–1816.
- Langer-Gould, A., Beaber, B.E., 2013. Effects of pregnancy and breastfeeding on the multiple sclerosis disease course. *Clin. Immunol.* 149, 244–250.
- Langer-Gould, A., Huang, S.M., Gupta, R., Leimpeter, A.D., Greenwood, E., Albers, K.B., Van Den Eeden, S.K., Nelson, L.M., 2009. Exclusive breastfeeding and the risk of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 66, 958–963.
- Manzon, L.A., 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 291–310.
- Martin, L.B., 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 70–76.
- Matera, L., Cesano, A., Bellone, G., Oberholtzer, E., 1992. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 6, 409–417.
- McCray, C.J., Agarwal, S.K., 2011. Stress and autoimmunity. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 31, 1–18.
- McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–442.
- Mok, C.C., Wong, R.W., Lau, C.S., 1998. Exacerbation of systemic lupus erythematosus by breast feeding. *Lupus* 7, 569–570.
- Montgomery, D.W., 2001. Prolactin production by immune cells. *Lupus* 10, 665–675.
- Nagafuchi, H., Suzuki, N., Kaneko, A., Asai, T., 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.
- Nunn, C., Rothschild, B., Gittleman, J., 2007. Why are some species more commonly afflicted by arthritis than others? A comparative study of spondyloarthropathy in primates and carnivores. *J. Evol. Biol.* 20, 460–470.
- Oberbeck, R., Schmitz, D., Wilsenack, K., Schuler, M., Biskup, C., Schedlowski, M., Nast-Kolb, D., Exton, M.S., 2003. Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. *J. Surg. Res.* 113, 248–256.
- Ogueta, S., Munoz, J., Obregon, E., Delgado-Baeza, E., Garcia-Ruiz, J.P., 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.
- Orbach, H., Shoenfeld, Y., 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 6, 537–542.
- Ostensen, M., 1992. The effect of pregnancy on ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28, 235–237.
- Ostensen, M., Villiger, P.M., 2007. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin. Immunopathol.* 29, 185–191.
- Quintanar, J.L., Salinas, E., Guerrero, R., Gomez, R., Vidal, S., Aranda, J., Clapp, C., 2007. Prolactin-like hormone in the nematode *Trichinella spiralis* larvae. *Exp. Parasitol.* 116, 137–141.
- Ratnay, L.G., Weinberg, J., Waterfield, J.D., 2000. The effect of lactation in the postpartum arthritis of MRL-*lpr*/fasmice. *Rheumatol. (Oxford)* 39, 646–651.
- Reichlin, S., 1988. Prolactin and growth hormone secretion in stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 245, 353–376.
- Reser, J., Reser, W., 2010. Does rheumatoid arthritis represent an adaptive, thrifty condition? *Med. Hypotheses* 74, 189–194.
- Rothschild, B., 2003. Osteoarthritis as a complication of artificial environment: the Cavia (Guinea pig) story. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1022–1023.
- Rothschild, B., 2005. Primate spondyloarthropathy. *Curr. Rheumatol Rep.* 7, 173–181.
- Rothschild, B., 2010. Macroscopic recognition of nontraumatic osseous pathology in the postcranial skeletons of crocodylians and lizards. *J. Herpetol.* 44, 13–20.
- Rothschild, B., Hao-Wen, T., Tao, D., 2013. Arthritis through geologic time and its environmental implications. *J. Anc. Dis. Prev. Rem.* 1 (101). <http://dx.doi.org/10.4172/jadpr1000101>.
- Rothschild, B., Panza, R., 2005. Epidemiologic assessment of trauma-independent skeletal pathology in non-passerine birds from museum collections. *Avian Pathol.* 34, 212–219.
- Rothschild, B., Rothschild, C., Woods, R., 2001a. Inflammatory arthritis in canids: spondyloarthropathy. *J. Zoo Wildl. Med.* 32, 58–64.
- Rothschild, B.M., 2001. Rheumatoid arthritis at a time of passage. *J. Rheumatol.* 28, 245–250.
- Rothschild, B.M., Prothero, D.R., Rothschild, C., 2001b. Origins of spondyloarthropathy in *Perissodactyla*. *Clin. Exp. Rheumatol.* 19, 628–632.
- Rothschild, B.M., Turner, K.R., DeLuca, M.A., 1988. Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the late Archaic period of Alabama. *Science* 241, 1498–1501.
- Saag, K.G., Choi, H., 2006. Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout. *Arthritis Res Ther.* 8 (Suppl. 1), S2.
- Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W., 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094–1108.
- Sharkey, P.F., Paskin, D.L., Meade, T.D., Rothman, R.H., 2007. Diet, nutrition, obesity, and their roles in arthritis. *Semin. Arthroplasty* 18, 117–121.
- Shelly, S., Boaz, M., Orbach, H., 2012. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 11, A465–A470.
- Shilton, C.M., Brown, G.P., Benedict, S., Shine, R., 2008. Spinal arthropathy associated with *Ochrobactrum anthropi* in free-ranging cane toads (*Chaunus [Bufo] marinus*) in Australia. *Vet. Pathol.* 45, 85–94.
- Turner, L., Neumann, I.D., 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5, 249–257.
- Turner, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R., Neumann, I.D., 2001. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.* 21, 3207–3214.
- van Vollenhoven, R.F., 2009. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. *BMC Med.* 7, 12.
- Vidaller, A., Guadarrama, F., Llorente, L., Mendez, J.B., Larrea, F., Villa, A.R., Alarcon-Segovia, D., 1992. Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient. *J. Clin. Immunol.* 12, 210–215.
- Waite, G.T., Whyte, A., 1987. Effect of pregnancy on collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 67, 467–476.
- Warrell, D.A., Cox, T.M., Firth, J.D., 2010. *Oxford Textbook of Medicine*, fifth ed. Oxford University Press, New York.
- Whittington, C.M., Wilson, A.B., 2013. The role of prolactin in fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 123–136.
- Wobeser, G., Runge, W., 1975. Arthropathy in white-tailed deer and a moose. *J. Wildl. Dis.* 11, 116–121.
- Yu-Lee, L.Y., 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 435–455.
- Zermeno, C., Guzman-Morales, J., Macotela, Y., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Kouri, J.B., Lavalle, C., de la Escalera, G.M., Clapp, C., 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J. Endocrinol.* 189, R1–R8.
- Zhornitsky, S., Yong, V.W., Weiss, S., Metz, L.M., 2013. Prolactin in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 19, 15–23.
- Zhou, J.F., Zadworny, D., Guemene, D., Kuhnlein, U., 1996. Molecular cloning, tissue distribution, and expression of the prolactin receptor during various reproductive states in *Meleagris gallopavo*. *Biol. Reprod.* 55, 1081–1090.