



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“ANÁLISIS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROLACTINA SOBRE LA
INFLAMACIÓN ARTICULAR Y LA EROSIÓN DEL HUESO EN LA ARTRITIS
INFLAMATORIA EXPERIMENTAL”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M. en C. MARIA GUADALUPE LEDESMA COLUNGA

TUTOR:

**DRA. MARIA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ LABORA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.**

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

JURIQUILLA, QUERÉTARO, MÉXICO. Mayo de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora.

JURADO DE EXAMEN

Integrantes:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Maria del Carmen Clapp Jiménez Labora

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Neurobiología y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de registro de becario 245828).

Agradezco el apoyo invaluable de las siguientes personas:

- El apoyo y tutoría de la Dra. Carmen Clapp, así como la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo. Asimismo, extendiendo mi gratitud al comité tutorial integrado por el Dr. Rogelio Arellano Ostoa y el Dr. Jesús Chimal Monroy, por el apoyo y asesoría en mi formación.
- Los consejos académicos del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera
- El apoyo técnico y la valiosa colaboración del Nut. Fernando López Barrera.
- La asistencia de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza de Estudios de Posgrado.
- La asistencia técnica del M. en C. Gabriel Nava Pinto y la labor asistencial de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.
- El apoyo del MVZ. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla, responsables del bioterio del Instituto de Neurobiología.
- A la Lic. Lourdes Lara Ayala por su hacer posible el servicio de videoconferencia en los exámenes tutorales.

A mis PADRES:

Eulalia y José Luis

“No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños, destrabar el tiempo, correr los escombros y destapar el cielo...”

Mario Benedetti

ÍNDICE	pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 El hueso: estructura y función	2
II.1.1 La regulación del proceso de remodelación ósea: actividad de los osteoclastos	6
II.2 La articulación sinovial y sus componentes	9
II.2.1 La cápsula articular	9
II.2.2 La membrana sinovial y el líquido sinovial	10
II.2.3 El cartílago articular	12
II.3 La artritis reumatoide: un padecimiento óseo-inflamatorio	12
II.3.1 El sinovio reumático	13
II.3.2 Erosión ósea en la artritis reumatoide	15
II.3.3 Patogénesis: modelos animales	18
II.3.3.1 Artritis inducida por adyuvante (AIA)	19
II.3.3.2 Artritis mono-articular inducida por adyuvante (MAIA)	20
II.4 Prolactina (PRL)	21
II.4.1 Estructura y función	21
II.4.2 Receptor de PRL (PRLR): mecanismo de acción y vías de señalización	22
II.4.3 Efectos de la PRL en tejido óseo	23
II.4.4 Efectos de la PRL en el sistema inmune	24
II.5 Implicaciones de la PRL en la AR: evidencias clínicas y experimentales	25
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
V.1 Objetivo General	28
V.2 Objetivos Específicos	28
VI. MÉTODOS	29
VI.1 Animales	29

VI.2 Inducción de artritis por el ACF en la rata (AIA)	29
VI.3 Inducción de hiperprolactinemia	30
VI.4 Inducción de artritis monoarticular por ACF EN el ratón (MAIA)	30
VI.5 Inyección intra-articular de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, and $IFN\gamma$ (Cyt)	30
VI.6 Determinación de los niveles circulantes de PRL	30
VI.7 Determinación de los niveles circulantes de proteína C-reactiva y $TNF\alpha$	31
VI.8 Análisis histopatológico de la articulación	31
VI.9 qRT-PCR	31
VI.10 Aislamiento y cultivo de fibroblastos sinoviales	32
VI.11 Co-cultivo de fibroblastos sinoviales y progenitores de osteoclastos	32
VI.12 Western blot	34
VI.13 Análisis estadístico	34
VII. RESULTADOS	36
VII.1 La PRL reduce la inflamación articular y la inflamación sistémica en el modelo de artritis poliarticular inducida por adyuvante (AIA) en la rata	36
VII.2 La PRL reduce la pérdida de hueso trabecular y la densidad de osteoclastos en la artritis inducida por adyuvante (AIA)	40
VII.3 La severidad de la artritis inducida por antígeno (MAIA) se incrementa en el ratón deficiente del receptor de PRL	43
VII.4 La falta del receptor de PRL aumenta la pérdida de hueso cortical y la densidad de osteoclastos en la artritis inducida por antígeno (MAIA)	46
VII.5 La inyección intra-articular de una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$) induce la expresión del receptor de PRL en la membrana sinovial y en cultivos primarios de fibroblastos sinoviales	48
VII.6 La PRL bloquea la expresión RANKL inducida por citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$) en fibroblastos sinoviales a través de la activación de la vía de STAT3	50
VII.7 La PRL reduce la osteoclastogénesis en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos	51
VII.8 Los condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos sinoviales expresan el mRNA del receptor de la PRL	53
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIONES	61
X. REFERENCIAS	62

XI. ÍNDICE DE FIGURAS	72
XII. ÍNDICE DE TABLAS	75
XIII. ANEXOS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Col1	Colágena tipo 1
Wnt	Wingless
TGFβ	factor de crecimiento transformante
BMP	proteína morfogenética de hueso
Col II	Colágena tipo II
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
TNF	Factor de necrosis tumoral
BRU	Unidad de remodelación ósea
MMP-9	Metaloproteasa de matriz 9
CatK	Catepsina K
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
GH	Hormona de crecimiento
PRL	Prolactina
AR	Artritis reumatoide
LEG	Lupus eritematoso generalizado
CPA	Células presentadoras de antígeno
IL-1β	Interleucina 1b
TNFα	Factore de necrosis tumoral a
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
NO	Óxido nítrico
Dkk-1	Dickkopf-1
LIF	Factor inhibitorio de leucemia

OSM	Oncostatina M
AIA	Artritis inducida por adyuvante
CIA	Artritis inducida por colágena
ACF	Adyuvante completo de Freund's
HSP	Proteína de choque térmico
PRLR	Receptor de PRL
JAK	Cinasa de Janus
STAT	transductor de señales y activador de la transcripción
MAPK	Proteína quinasa activadora de mitógenos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PL	Lactógeno placentario
IFNγ	Interferón gamma
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
Cyt	Combinación de citocinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1 β , IFN γ
PCR	Proteína C-reactiva

RESUMEN

La hormona prolactina (PRL) reduce la inflamación articular, la formación de pannus y la destrucción del hueso en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). En este estudio, se investigó el mecanismo de protección de PRL contra la pérdida de hueso en un modelo de artritis en rata (AIA) y en un modelo de AIA-monoarticular (MAIA) en ratón. La inflamación articular, la pérdida de hueso trabecular y la osteoclastogénesis se evaluaron en ratas con AIA tratadas con PRL (administrada vía bombas osmóticas de infusión) y en ratones con MAIA deficientes (*Prlr*^{-/-}) o no (*Prlr*^{+/+}) del receptor de PRL. Asimismo, se evaluó el efecto de la PRL sobre posibles células blanco utilizando cultivos de fibroblastos sinoviales provenientes de ratones *Prlr*^{+/+}, tratados o no con una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β , and IFN γ) en presencia o ausencia de PRL, y se co-cultivaron con y sin células progenitoras de osteoclastos. En AIA, el tratamiento con PRL mitigó la hinchazón de la articulación, incrementó el área de hueso trabecular y redujo la densidad de osteoclastos. No obstante, la PRL disminuyó la expresión del mRNA de genes asociados a osteoclastos [(fosfatasa ácido tartrato-resistente (*Trap*), catepsina K (*Ctsk*), metaloproteinasa-9 (*Mmp9*) y *Tnfrsf11a*, (gen que codifica para el receptor activador del factor nuclear κ B)] y genes con actividad osteoclastogénica [*Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il17a*, y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (*Tnfrsf11*)]. En MAIA, el ratón *Prlr*^{-/-} mostró un aumento en la hinchazón de la articulación, disminución del área de hueso trabecular, incremento en la densidad de osteoclastos y mayor expresión del mRNA de *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il17a*, *Trap*, *Tnfrsf11a*, y *Tnfrsf11* respecto al ratón *Prlr*^{+/+}. Por otra parte, la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL se incrementó en articulaciones artríticas, en membranas sinoviales y en fibroblastos sinoviales tratados con Cyt. El mecanismo celular de la protección conferida por la PRL incluyó la fosforilación/activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y la inhibición de la expresión de *Il1b*, *Il6*, y *Tnfrsf11* inducida por Cyt en fibroblastos sinoviales. Aunado a estos hallazgos, el tratamiento con el inhibidor de STAT3 (S31-201) bloqueó la inhibición por PRL de la expresión de *Tnfrsf11*. Finalmente, la PRL actuó sobre co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células precursoras de osteoclastos regulando a la baja la diferenciación de osteoclastos inducida por las Cyt. En conclusión, la PRL protege contra la osteoclastogénesis y la pérdida de hueso en las artritis inflamatorias a través de la inhibición de la expresión de *Tnfrsf11* inducida por citocinas proinflamatorias en la articulación y en fibroblastos sinoviales vía la activación de la cascada de señalización de STAT3. Fármacos capaces de inducir hiperprolactinemia podrían tener valor terapéutico potencial contra la inflamación y la pérdida de hueso en la artritis.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) reduces joint inflammation, pannus formation, and bone destruction in rats with polyarticular adjuvant-induced arthritis (AIA). Here, we investigate the mechanism of PRL protection against bone loss in AIA and in monoarticular AIA (MAIA). Joint inflammation, trabecular bone loss, and osteoclastogenesis were evaluated in rats with AIA treated with PRL (via osmotic minipumps) and in mice with MAIA that were null (*Prlr*^{-/-}) or not (*Prlr*^{+/+}) for the PRL receptor. To help define target cells, synovial fibroblasts from *Prlr*^{+/+} mice were treated or not with proinflammatory cytokines (Cyt: TNF α , IL-1 β , and IFN γ) with or without PRL, and these synovial cells were co-cultured or not with bone marrow osteoclast progenitors. In AIA, PRL treatment reduced joint swelling, increased trabecular bone area, lowered osteoclast density, and reduced mRNA levels of osteoclast-associated genes [tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*), cathepsin K (*Ctsk*), matrix metalloproteinase 9 (*Mmp9*), and *Tnfrsf11a* (receptor activator of nuclear factor κ B (*Tnfrsf11a*))] and of genes encoding cytokines with osteoclastogenic activity [*Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il17a*, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (*Tnfrsf11*)]. *Prlr*^{-/-} mice with MAIA showed enhanced joint swelling, reduced trabecular bone area, increased osteoclast density, and elevated expression of *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il17a*, *Trap*, *Tnfrsf11a*, and *Tnfrsf11*. The expression of the long PRL receptor form increased in arthritic joints, and in synovial membranes and cultured synovial fibroblasts treated with Cyt. PRL induced the phosphorylation/activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) and inhibited the Cyt-induced expression of *Il1b*, *Il6*, and *Tnfrsf11* in synovial fibroblast cultures. The STAT3 inhibitor S31-201 blocked inhibition of *Tnfrsf11* by PRL. Finally, PRL acted on co-cultures of synovial fibroblasts and osteoclast precursor cells to down-regulate Cyt-induced osteoclast differentiation. PRL protects against osteoclastogenesis and bone loss in inflammatory arthritis by inhibiting cytokine-induced activation of *Tnfrsf11* in joints and synovial fibroblasts via its canonical STAT3 signaling pathway. Hyperprolactinemia-inducing drugs have therapeutic potential against inflammation and bone loss in arthritis.

I. INTRODUCCIÓN

La estructura del tejido óseo se mantiene debido a un delicado balance entre la resorción de hueso mineralizado que conlleva a la formación de hueso nuevo, implicando que bajo condiciones fisiológicas, la cantidad de hueso formado es igual a la cantidad de hueso reabsorbido. Este proceso permite la adaptación del hueso a cambios biomecánicos y la reparación de microlesiones en la arquitectura ósea. La disrupción de este balance, hacia la resorción de hueso y la disminución en su reparación, ocurre en padecimientos inflamatorios, como la artritis reumatoide (AR). En la AR, los cambios erosivos en el hueso determinan la pérdida ósea progresiva y contribuyen a la morbilidad asociada a la enfermedad. El principal desencadenante es la inflamación de la membrana sinovial, que produce citocinas proinflamatorias, el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) y auto-anticuerpos. Estos factores estimulan la diferenciación de las células responsables de la reabsorción ósea, los osteoclastos. Por lo que las diferentes modalidades de tratamiento contra la AR se enfocan en inhibir la inflamación y la consecuente degradación ósea. Sin embargo, no es posible revertir las lesiones óseas y los enfoques terapéuticos se enfocan en su prevención. Al respecto, la hormona prolactina (PRL) podría tener estas implicaciones terapéuticas en la AR. La PRL promueve el desarrollo del esqueleto fetal durante el embarazo a través de estimular la formación normal del hueso y de inhibir su resorción. Sin embargo, durante la lactancia la PRL promueve la resorción de hueso para favorecer la concentración de calcio en la leche. Estas acciones opuestas parecen depender de interacciones multifactoriales asociadas con el estado fisiológico del organismo. La PRL aumenta en la circulación en algunos pacientes con AR y estudios recientes muestran que esta hormona promueve la supervivencia del cartílago y atenúa la inflamación, disminuyendo el daño articular permanente en la artritis inflamatoria experimental (Adan et al., 2013). En la presente tesis demostramos el mecanismo por el que la PRL actúa protegiendo contra la erosión del hueso en la artritis. Encontramos que la PRL bloquea la erosión ósea a través de inhibir la expresión del RANKL y de su receptor en respuesta a citocinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$). Que este efecto incluye acciones directas sobre los fibroblastos sinoviales a través de la activación de la vía de STAT3 y se traduce en la inhibición de la osteoclastogénesis y de la pérdida de trabéculas óseas en la articulación artrítica.

II. ANTECEDENTES

II.1 El hueso: función y estructura

El tejido óseo o hueso es un tejido conectivo altamente especializado que se compone por fibras elásticas de colágeno y cristales de calcio que proveen rigidez y fuerza al esqueleto permitiendo el movimiento y la locomoción, y que tiene la capacidad de regenerarse y repararse (Bayliss et al., 2012). Este tejido participa en diversas funciones fisiológicas que incluyen la hematopoyesis, el reservorio mineral de calcio, la producción de factores de crecimiento y citocinas, y el equilibrio ácido base en el organismo (Taichman, 2005).

El tejido óseo se puede dividir en dos tipos: maduro e inmaduro. El hueso inmaduro incluye el tejido fibroso o hueso esponjoso, que contiene fibras de colágeno orientadas aleatoriamente. Por otra parte, el hueso maduro se forma después de un proceso de resorción o remodelamiento, y se le denomina hueso lamelar (Burr et al., 2011). Siendo el hueso trabecular y el hueso cortical, los componentes primarios del tipo de hueso lamelar (Ralston y McInnes, 2014).

La arquitectura del hueso cortical, se encuentra predominantemente en los huesos largos de las extremidades; provee soporte estructural y consiste de un canal Haversiano, que contiene vasos sanguíneos y nervios, rodeado por laminillas con lagunas conteniendo células óseas. Adicionalmente, se recubre por el periostio, un tejido conectivo denso, que reviste todo el hueso, excepto las áreas tapizadas por cartílago (Kini y Nandeesh, 2012; Walsh, 2015). Por otra parte, el hueso trabecular se encuentra principalmente en las vértebras, la pelvis y en las terminaciones de los huesos largos. Es una estructura en forma de panel, un enrejado de vértices y varillas separado por espacios, que contiene a la médula ósea y proporciona la resistencia mecánica del esqueleto (Clarke, 2008). El hueso lamelar está conformado de una matriz, cuyos componentes son fundamentalmente orgánicos e inorgánicos. La porción orgánica, está constituida de fibras que son

casi exclusivamente de colágena tipo 1 (Col1). Adicionalmente, se arreglan diferentes glucoproteínas cuya producción es restringida al hueso y que incluyen proteoglicanos, osteocalcina, osteopontina y osteonectina (Brodsky y Persikov, 2005). Por otra parte, la porción inorgánica, se constituye de calcio y fósforo que existen primordialmente en forma de cristales de hidroxapatita distribuidos de manera ordenada a lo largo de las fibras de Col1, y cuya relación provee dureza y resistencia (Clarke, 2008).

A nivel celular, los huesos (Figura 2) están constituidos por células formadoras y de soporte denominadas osteoblastos y osteocitos, respectivamente; células remodeladoras, conocidas como osteoclastos, y células de revestimiento que cubren la superficie del hueso (Lian et al., 2012; Florencio-Silva et al., 2015).

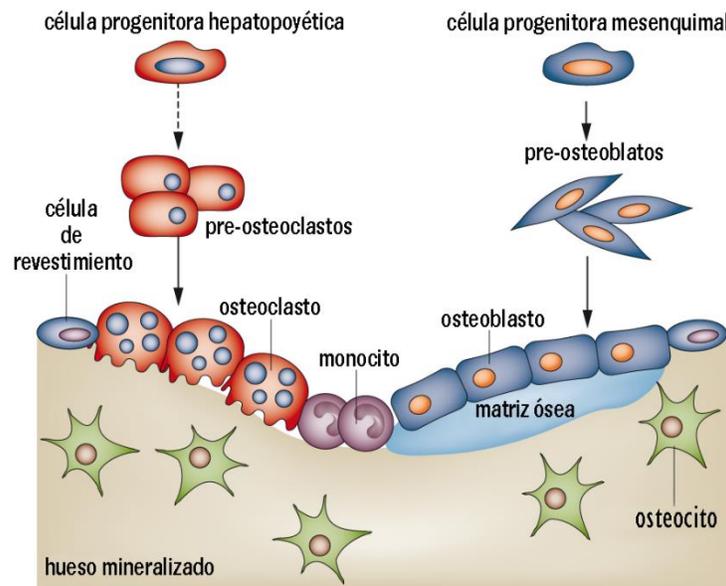


Figura 1. Componentes y origen celular del tejido óseo. Se presenta un esquema ilustrativo de la localización de las células de revestimiento, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos en contacto con las células contenidas en la médula ósea en un corte de hueso mineralizado. Extraída y modificada de Lian *et al.*, 2012.

Los osteoblastos son células mononucleadas que varían en morfología de acuerdo a su actividad y madurez (Kini y Nandeesh, 2012). Estas células comprenden del 4 al 6% del total de células en la superficie ósea y son las responsables de la síntesis y mineralización de la matriz ósea, y la regulación de la actividad de los osteoclastos (Pittenger et al., 1999). Los osteoblastos son de origen mesenquimal a partir de células progenitoras de la médula ósea que dan origen a otras estirpes celulares como condrocitos, células musculares y adipocitos. Por lo que el compromiso para el linaje de osteoblastos dependerá de la activación específica de los factores de transcripción que inducirán su diferenciación. El proceso de osteoblastogénesis, involucrará la expresión de Runx2, Cbfa1 y Osx en células progenitoras (Ogawa et al., 1993; Komori, 2003); así como la activación de la vía canónica de Wntless (Wnt) y la vía del factor de crecimiento transformante (TGF- β) / proteína morfogenética de hueso (BMP), esenciales en la maduración de los osteoblastos (Krishnan et al., 2006). A medida que los osteoblastos se diferencian, se lleva a cabo la síntesis de proteínas de la matriz ósea, principalmente la colágena tipo II (Col II) (Mackie, 2003). En última instancia, los osteoblastos maduros se integran en la matriz ósea dando lugar a los osteocitos, que gradualmente limitarán la secreción de los componentes de la matriz orgánica (Neve et al., 2011). Por otra parte, las células de revestimiento óseo de morfología plana son osteoblastos que cubren las superficies óseas cuando no tiene lugar la resorción ni la formación ósea. Estas células impiden la interacción directa entre los osteoclastos y la matriz ósea en condiciones donde la resorción ósea no debe ocurrir, pero también pueden contribuir a la remodelación ósea produciendo OPG y RANKL para la diferenciación de los osteoclastos (Florencio-Silva et al., 2015).

Los osteocitos representan osteoblastos terminalmente diferenciados que proveen soporte a la estructura y contribuyen al metabolismo óseo. Los osteocitos se localizan en el interior del hueso y son las células más abundantes que también contribuyen en la síntesis y mineralización de la matriz ósea. Sin embargo, su función principal es controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones

mecánicas de las cargas (Aarden et al., 1994) a través de prolongaciones de su membrana plasmática que les permite comunicarse con los osteoclastos y osteoblastos, controlando cómo y cuándo reabsorber y formar hueso, respectivamente (Kini y Nandeesh, 2012). Adicionalmente, los osteocitos controlan la formación de hueso secretando esclerostina que antagoniza a diversos miembros de la familia BMP y a los receptores LRP5/LRP6 previniendo así la activación de Wnt, regulando negativamente la diferenciación de los osteoblastos (Burr et al., 2011).

Los osteoclastos son células grandes derivadas del linaje monocito / macrófago y son típicamente multinucleadas. Estos son el único tipo celular capaz de reabsorber el hueso (Boyle et al., 2003). Su función es la degradación localizada de la matriz ósea. La diferenciación de osteoclastos es regulada por dos citocinas esenciales: el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL). El M-CSF es considerado el factor responsable de la proliferación y supervivencia de células precursoras de osteoclastos (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). RANKL es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y es expresado por osteoblastos, células T, células B, condrocitos y fibroblastos sinoviales. La interacción de RANKL y su receptor activador para el factor nuclear κ B en células precursoras, induce la diferenciación de los osteoclastos y estimula su función (Yasuda et al., 1998). La importancia del RANKL en la diferenciación y activación de los osteoclastos se demostró usando ratones knockout para este factor. Estos animales desarrollan, severa osteopetrosis (con huesos densos y quebradizos) debido a la total ausencia de osteoclastos (Fuller et al., 1998).

La actividad de los osteoclastos también es regulada por osteoprotegerina (OPG) y calcitonina. La OPG, otra de las proteínas sintetizadas por los osteoblastos, es un receptor soluble para RANKL que secuestra a RANKL y le impide actuar sobre su receptor (RANK). La calcitonina es secretada por células parafoliculares en la glándula tiroides y se une directamente a sus receptores en

osteoclastos inhibiendo su actividad osteoclástica. OPG inhibe el reclutamiento, proliferación y activación de osteoclastos (Yasuda et al., 1998). La ablación genética de OPG conduce al desarrollo de osteoporosis mientras que la sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos se asocia a una osteopetrosis severa (Bucay et al., 1998; Stolina et al., 2007).

II.1.1 La regulación del proceso de remodelación ósea: actividad de los osteoclastos

El remodelamiento del hueso se define como una serie de fases secuenciales que involucran la activación, la resorción y la formación de hueso con la finalidad de mantener la masa ósea o reparar daños ocasionados a su microestructura tras una lesión (Burr et al., 2011).

El remodelamiento óseo, en condiciones fisiológicas requiere de la participación coordinada de resorción y formación de hueso, que dependerán del desarrollo y activación de osteoclastos y osteoblastos, respectivamente. El acoplamiento de ambos tipos celulares vía señales parácrinas conforma a las unidades de remodelación ósea (BRU) que se distribuyen al azar en aquellas áreas que requieren reparación (Parfitt, 1994).

El proceso implica el reclutamiento y activación de células progenitoras de osteoclastos desde la médula ósea y el torrente sanguíneo, resultando en la interacción de precursores de osteoclastos y precursores de osteoblastos, lo que da lugar a la diferenciación, migración y fusión de grandes osteoclastos multinucleados. Estas células se adhieren a la superficie mineralizada del hueso donde inician la resorción a través de la secreción de ácido clorhídrico que solubiliza el calcio, metaloproteasa de matriz 9 (MMP), catepsina K y fosfatasas (fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)) para degradar la matriz ósea remanente, incluyendo el colágeno, cuyos restos son fagocitados por macrófagos (Kini y Nandeesh, 2012). Al desplazarse los osteoclastos sobre la superficie del hueso y reabsorber la matriz, forman pequeñas cavidades y permiten con ello la

liberación de factores de crecimiento contenidos dentro de esta, fundamentalmente se libera el TGF- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Hadjidakis y Androulakis, 2006)

Al terminar la fase de resorción, las cavidades de resorción o lagunas contienen monocitos y osteocitos liberados de la matriz ósea y pre-osteoblastos reclutados para comenzar la formación de hueso nuevo (Burr et al., 2011). Los pre-osteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la cual se ancla la estructura del hueso nuevo que es el sitio donde tiene lugar su diferenciación a osteoblastos. Al concluir la diferenciación, los osteoblastos (ya diferenciados) sintetizan la matriz ósea que recubre las zonas perforadas. Y finalmente, los osteoblastos detienen la síntesis y se transforman en células de revestimiento quiescentes (osteocitos) que cubren completamente la superficie ósea recién formada (Kini y Nandeesh, 2012).

La regulación del remodelamiento óseo implica que la cantidad de hueso formado debe ser igual a la cantidad de hueso reabsorbido (Hadjidakis y Androulakis, 2006). Durante este proceso, el sistema RANKL-RANK-OPG parece ser determinante en el control de cada fase. Sin embargo, las hormonas también participan regulando el equilibrio entre la reabsorción, la formación y la integridad general del hueso.

Las hormonas paratiroideas son el regulador más importante de la homeostasis del calcio, promueven la formación ósea cuando se administra de forma intermitente y la resorción ósea cuando se secretan en forma sostenida (Kini y Nandeesh, 2012). El calcitriol (la forma activa de la vitamina D3) determina la mineralización ósea y ejerce un efecto metabólico durante el recambio óseo. Mientras que, la calcitonina inhibe la actividad de resorción ósea de los osteoclastos. Además de las hormonas calcémicas primarias, otras hormonas desempeñan un papel importante en el

metabolismo óseo (Clarke, 2008). La hormona de crecimiento (GH) / IGH-1 promueve el crecimiento esquelético durante el desarrollo y son los principales determinantes del mantenimiento de la masa ósea en adultos (Wang et al., 2004). Los glucocorticoides son deletéreos para todas las funciones esqueléticas. Sin embargo, también ejercen efectos estimuladores sobre las células óseas (Weinstein et al., 1998). Las hormonas tiroideas estimulan tanto la resorción ósea como la formación ósea (Britto et al., 1994).

En cuanto a los esteroides gonadales, los andrógenos son esenciales para el crecimiento y mantenimiento del esqueleto (Sato et al., 2002). Considerando que, los estrógenos tienen diversos efectos sobre el metabolismo óseo, que incluye la inhibición de la resorción ósea por inducir la apoptosis de los osteoclastos y bloquear su maduración. Además, los estrógenos estimulan la producción de OPG por los osteoblastos, disminuyendo la respuesta de los osteoclastos a RANKL (Srivastava et al., 2001). A su vez, los estrógenos son potentes activadores de la secreción hipofisiaria de prolactina (PRL) y los datos recientes muestran que la PRL también tiene una influencia en el metabolismo óseo. La PRL es un importante regulador del transporte intestinal de calcio y su receptor se expresa en células óseas (osteoblastos) durante el desarrollo fetal (Freemark et al., 1997; Charoenphandhu y Krishnamra, 2007). El ratón deficiente del receptor de PRL es osteopénico y presenta una baja tasa de formación ósea (Clement-Lacroix et al., 1999), apoyando que la PRL promueve el mantenimiento de la masa ósea a través de una posible acción directa sobre células del tejido óseo.

El desequilibrio entre la formación y resorción ósea, favoreciendo la actividad de los osteoclastos resulta en erosión ósea (u osteólisis) ocasionada por diversos procesos patológicos, incluyendo cáncer, hiperparatiroidismo y enfermedades inflamatorias crónicas como histiocitosis, sarcoidosis y la causa más común es artritis reumatoide (AR) (Schett y Gravallese, 2012).

II.2 La articulación sinovial: componentes y estructura

Una articulación es la estructura formada por la unión de dos o más huesos revestidos por cartílago que permite al esqueleto una variedad de grados de movimiento. Las articulaciones pueden clasificarse dentro de tres diferentes grupos: fibrosas (articulaciones sin movilidad), cartilagosas (articulaciones con movilidad limitada) y sinoviales (articulaciones móviles). Las articulaciones sinoviales (**Figura 2**) son estructuras que se componen de huesos, cartílago hialino y una cápsula articular que encierra la cavidad articular (Paulsen y Waschke, 2013; Ralston y McInnes, 2014; Goldring y Goldring, 2017).

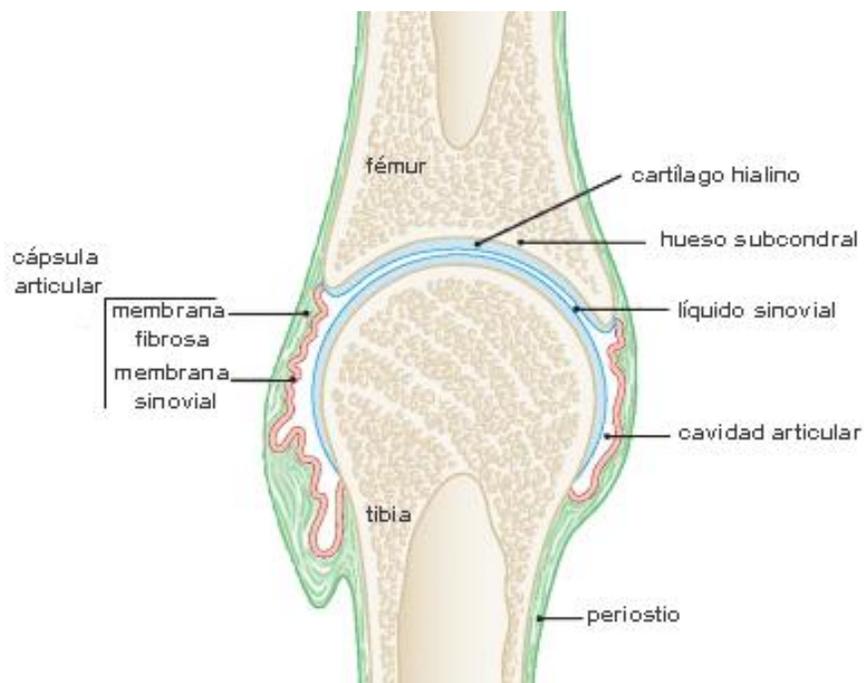


Figura 2. Estructura general de una articulación sinovial. Se muestra un esquema de un corte transversal de la articulación sinovial tibio-femoral y se señala sus componentes: huesos (tibia y fémur), cápsula articular (membrana fibrosa y membrana sinovial), cartílago hialino, hueso subcondral, líquido sinovial, cavidad articular y periosteo. Extraído y modificado de Paulsen y Waschke, 2013.

II.2.1 La cápsula articular

La cápsula encierra a la cavidad articular y consiste de una membrana fibrosa externa y una membrana sinovial interna (o sinovio). La membrana fibrosa externa está formada por tejido

conectivo junto con los ligamentos y tendones, que estabiliza a la articulación, asegurando el posicionamiento de las superficies articulares. Mientras que, la membrana sinovial es una estructura vascularizada que produce líquido sinovial, el cual se infiltra en la cavidad articular y lubrica y nutre las superficies articulares (Ralston y McInnes, 2014).

II.2.2 La membrana sinovial y el líquido sinovial

La membrana sinovial recubre a las articulaciones diartrodiales o móviles. Se localiza adherida al tejido muscular y provee una superficie no adherente entre los elementos articulares: cartílago y hueso. La membrana sinovial consiste de dos capas: la capa íntima y la capa subíntima (Figura 3) (Smith y Walker, 2011).

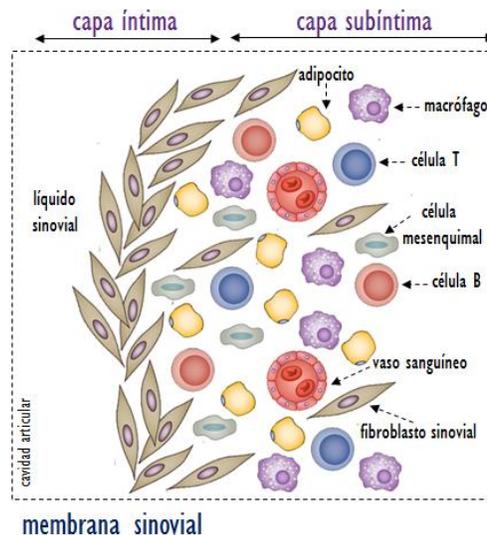


Figura 3. Componentes celulares de la membrana sinovial. Esquema de las células que componen a la membrana sinovial. La capa íntima está en contacto con el líquido sinovial y la capa subíntima que contiene vasos sanguíneos y diferentes poblaciones celulares intercaladas: células T, células B, adipocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales (Smith y Walker, 2011).

La capa íntima presenta células especializadas: macrófagos y fibroblastos embebidos en una matriz amorfa y granular (Iwanaga et al., 2000). Bajo condiciones normales, las células sinoviales forman una capa interconectada discontinua de 1-3 células de espesor (20-40 μm) entre la subíntima y la

cavidad articular. Las capas no se separan por una lámina basal, distinguiéndose entre sí únicamente por la asociación de las células sinovial subintimales en una capa superficial. La subíntima se compone de tejido conectivo suelto e irregular, con fibras de colágeno y elastina que se organizan de forma paralela a la superficie de la membrana intercaladas con fibroblastos, macrófagos, células T, células B, mastocitos y adipocitos (Barland et al., 1962).

Existen al menos dos poblaciones morfológicamente diferentes de células sinoviales o sinoviocitos: tipo A y tipo B. Los sinoviocitos tipo A son células tipo macrófago que expresan marcadores de superficie como: CD14, CD11b, receptores Fc y se caracterizan por presentar filopodia, un aparato de Golgi prominente, lisosomas y vacuolas. Estas células tienen un retículo endoplásmico escaso debido a que son principalmente células fagocíticas, cuya función es eliminar restos articulares del líquido sinovial. En contraste, los sinoviocitos tipo B, que predominan, expresan en superficie CD55 y carecen de marcadores de fibroblastos y receptores Fc y presentan una estructura semejante a fibroblastos, con abundante retículo endoplásmico, y menor contenido de vacuolas y vesículas (Smith y Walker, 2011). Estas células participan en la síntesis de los componentes del líquido sinovial: hialuronato y lubricina. Los sinoviocitos no se dividen activamente en las membranas sinoviales normales, pero bajo condiciones de trauma e inflamación incrementan su tasa de proliferación. Bajo tales condiciones, los sinoviocitos tipo B proliferan, mientras que los sinoviocitos tipo A incrementan a partir de la migración de precursores derivados de la médula ósea (Qu et al., 1994).

El líquido sinovial, es un fluido claro o de color amarillo que corresponde a un ultrafiltrado del plasma. Es un fluido rico en ácido hialurónico y en la glicoproteína, lubricina, producidos por las células sinoviales. Las concentraciones de iones pequeños y moléculas (Na^+ , K^+ , glucosa, urea) son similares a las concentraciones en el plasma; mientras que moléculas grandes están ausentes.

La principal función del líquido sinovial es actuar como lubricante y proveer los nutrientes necesarios para el mantenimiento del cartílago avascular (Ogston y Stanier, 1953; Ralston y McInnes, 2014).

II.2.3 El cartílago articular

El movimiento de las articulaciones ocurre sin daño estructural dada la presencia del cartílago que recubre la superficie de los huesos, mitigando así la fricción entre ellos. En condiciones normales, el cartílago articular es avascular y carente de inervación. Al no poseer vasos sanguíneos ni linfáticos, su nutrición y recambio depende exclusivamente del líquido sinovial y la vasculatura ósea subcondral (Goldring, 2006). El cartílago posee una escasa y única población de células denominadas condrocitos, que se encargan de producir y secretar componentes de la matriz extracelular en la que se encuentran embebidos, manteniendo así el equilibrio entre la tasa de recambio de los componentes de la matriz. Dentro de los componentes de la matriz se incluyen colágenas, proteoglicanos, y proteínas diferentes de colágenas. El tipo de colágena predominante es el tipo II (Col II), aunque también pueden encontrarse los tipos VI, IX, X y XI (Heinegard et al., 2011).

II.3 La artritis reumatoide (AR): un padecimiento inflamatorio-óseo

El desequilibrio en el proceso de remodelación ósea está estrechamente relacionado a diversos tipos de enfermedades óseas, como la osteoporosis, la osteopetrosis y la artritis reumatoide (AR). La AR forma parte de las artritis inflamatorias un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan a las articulaciones e incluyen a las espondiloartropatías, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, la artritis idiopática juvenil, y la osteoartritis. La característica que comparten es la propensión a destruir los componentes articulares como consecuencia de la inflamación, lo que resulta eventualmente en una severa discapacidad motriz (Goldring y Gravalles, 2000). La AR es uno de los tipos más comunes de artritis inflamatoria, afecta aproximadamente al 1% de la población

mundial del cual 75% son mujeres (Alamanos y Drosos, 2005). Este padecimiento presenta un componente autoinmune que estimula la producción de auto-anticuerpos por una activación anormal de células no linfoides, promoviendo la destrucción de los tejidos, particularmente articulares.

Diversos reportes señalan que pacientes con condiciones inflamatorias (como la AR) presentan una mayor propensión a desarrollar osteoporosis (Takayanagi, 2009; Feng y McDonald, 2011). Bajo estas condiciones, la inflamación caracterizada por la activación de diversas poblaciones de células inmunes y la producción de citocinas pro-inflamatorias perturba la homeostasis ósea normal e induce la degradación del cartílago y hueso, a nivel local y sistémico a través de promover la actividad de los osteoclastos e inhibir la formación ósea por los osteoblastos (Goldring y Gravalles, 2000).

II.3.1 El sinovio reumático

Diversos estudios han señalado que el desarrollo de la AR involucra a factores desconocidos que inducen el que proteínas propias sean reconocidas como extrañas (auto-antígenos) por el sistema inmunológico. El auto-reconocimiento mediado por auto-anticuerpos (factor reumatoide y anticuerpos anti-citrulina) permite el desarrollo de un proceso inflamatorio en la membrana sinovial (sinovitis) que se vuelve crónico. Se ha descrito que el inicio de la presentación de auto-antígenos, llevada a cabo por las células presentadoras de antígeno (CPA) que activan a los linfocitos Th1 (CD4+), tiene lugar en la articulación. Este proceso estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias que inducen la expresión de diversas moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) y quimiocinas en el endotelio vascular que promueven la infiltración de linfocitos T y B, monocitos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos a la cavidad articular (Goldring, 2003; McInnes y Schett, 2007). La menor apoptosis y mayor retención y proliferación de células infiltradas y células residentes

conlleva a la formación de un frente inflamatorio denominado pannus en la interface de la membrana sinovial y el cartílago/hueso (Figura 4).

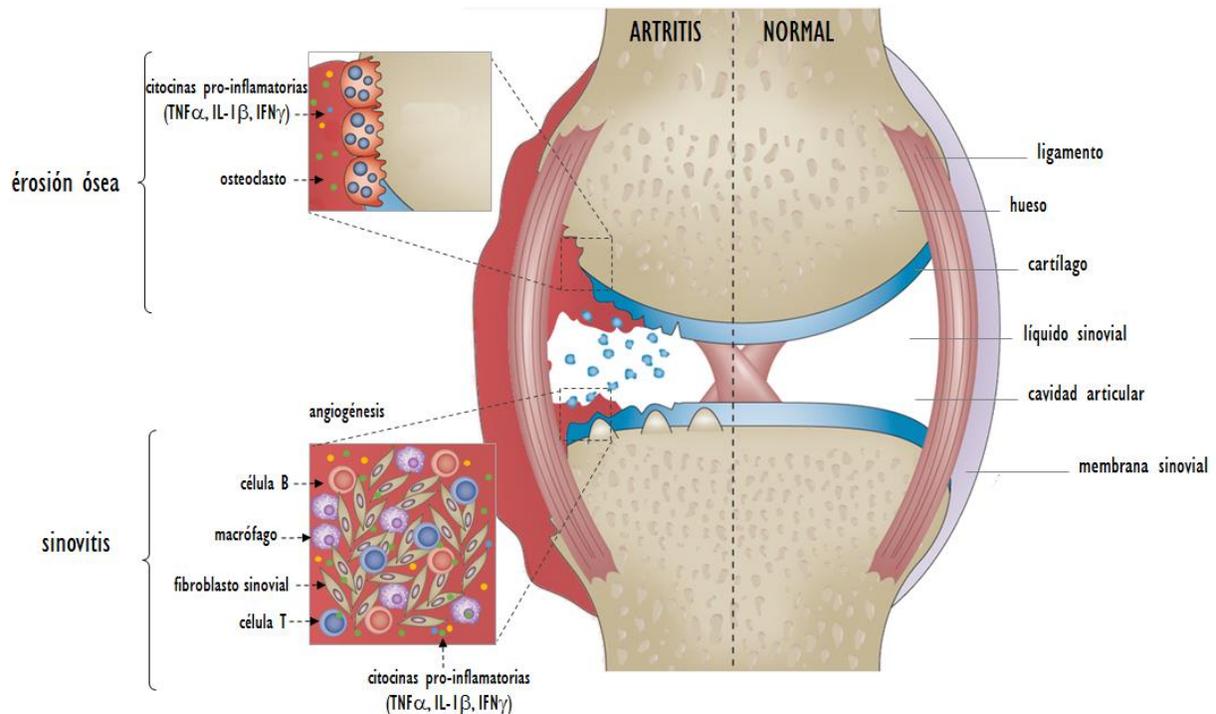


Figura 4. Inflamación articular en la AR. Esquema que ilustra el proceso inflamatorio articular que ocurre en la AR. En la articulación normal, el sinovio consiste de una membrana sinovial (usualmente de dos capas de células de espesor) y tejido conectivo. En la AR, la membrana sinovial se engrosa, por hiperplasia e hipertrofia de las células locales (fibroblastos sinoviales y macrófagos), proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y la infiltración de células T y células B generando un frente inflamatorio denominado pannus en la interface de la membrana sinovial y el cartílago/hueso que induce la diferenciación y activación de osteoclastos gracias al microambiente formado por citocinas pro-inflamatorias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$). Modificado de McInnes y Schett, 2007.

Aunque los mecanismos de destrucción de la articulación no han sido completamente dilucidados, se ha descrito que el sinovio inflamado es una fuente primaria de factores que contribuyen al reclutamiento, la diferenciación y la activación de osteoclastos. Dentro de estos factores sobresale la interleucina 1β ($IL-1\beta$), el factores de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$), la interleucina 6 ($IL-6$) y, las más

recientemente descritas citocinas producidas por la células colaboradoras Th17 (IL-17 principalmente) (Choy y Panayi, 2001). Asimismo, estas citocinas estimulan la producción de óxido nítrico (NO) que promueve la muerte por apoptosis de los condrocitos, ocasionando de esta forma daño articular permanente al hueso y al cartílago (Blanco et al., 1995).

II.3.2 Erosión ósea en la artritis reumatoide

El incremento de las poblaciones de osteoclastos en las zonas cercanas al pannus (**Figura 4**), muestra su participación activa en la erosión del hueso, que se confirma mediante el incremento en su actividad (evaluada por la actividad de la TRAP) y la inhibición de los mecanismos de formación de hueso dada por los osteoblastos (van de Wijngaert y Burger, 1986). Esto ocasiona una alteración de la homeostasis ósea en la AR promovida por la acumulación de factores osteoclastogénicos en el sinovio reumático que estimulan el reclutamiento de los precursores de osteoclastos y su diferenciación a osteoclastos maduros y activos (Amarasekara et al., 2015).

Dentro de las citocinas responsables, el $TNF\alpha$ juega un papel central. El $TNF\alpha$ es expresado principalmente por macrófagos, sinoviocitos y células T en el sinovio reumático (Butler et al., 1995). Esta citocina es capaz de inducir la expresión de otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-8. Asimismo, $TNF\alpha$ actúa sinérgicamente con RANKL para promover la osteoclastogénesis y la supervivencia y longevidad de osteoclastos maduros a través de estimular la expresión de M-CSF (Lee et al., 2001). No obstante, $TNF\alpha$ puede estimular la actividad osteoclastogénica independiente de RANKL al interactuar directamente con IL-1 β . (O'Gradaigh et al., 2004). Adicionalmente se ha demostrado que $TNF\alpha$ inhibe directamente la diferenciación de osteoblastos y la formación de nódulos óseos (Tsukasaki et al., 2011). Además, $TNF\alpha$ induce la expresión de Dickkopf-1 (Dkk-1) un antagonista de Wnt bloqueando la formación de hueso a través de la inhibición de esta vía de señalización en osteoblastos (Diarra et al., 2007). La relevancia de la

participación de $TNF\alpha$ en la erosión ósea se ha demostrado en estudios con animales transgénicos o animales deficientes del factor. La sobre expresión de $TNF\alpha$ resulta en un cuadro de poliartritis similar a la AR en humanos (Keffer et al., 1991). Por otro lado, la deficiencia genética o el bloqueo de $TNF\alpha$ (utilizando anticuerpos anti- $TNF\alpha$) resulta en menor inflamación y reducción de la osteoclastogénesis y erosión ósea (Binder et al., 2013).

La $IL-1\beta$ y el $TNF\alpha$ regulan la inflamación en el sinovio reumático y estimulan la degradación del cartílago y el hueso a través de inducir la secreción de proteasas que hidrolizan los constituyentes de la matriz (Arend, 2001). $IL-1$ pertenece a una familia de citocinas que incluyen a $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-1Ra$, $IL-18$ y recientemente añadidas, $IL-36$ e $IL-37$ y es producida por macrófagos y fibroblastos sinoviales principalmente (Dinarello, 1996; Gravallesse y Monach, 2016). Estas citocinas estimulan la resorción ósea a través de una acción primaria sobre los osteoblastos. Estudios *in vitro* muestran que la $IL-1\beta$ promueve la fusión de precursores de osteoclastos y prolonga la supervivencia de osteoclastos maduros (Thomson et al., 1986). Asimismo, la $IL-1\beta$ estimula la producción de RANKL, originando un desequilibrio en la relación RANKL/OPG en el sinovio reumático (Wei et al., 2005). Aunado a esto, los estudios realizados en modelos animales muestran que la sobre-expresión de $IL-1\alpha$ o $IL-1\beta$; o la delección de su receptor antagonista soluble ($IL-Ra$) estimula el desarrollo de artritis y la destrucción del cartílago y el hueso (Horai et al., 2000; Niki et al., 2004).

$IL-6$ pertenece a la familia de citocinas que incluyen a la $IL-11$, el factor inhibitorio de leucemia (LIF) y la oncostatina M (OSM). La $IL-6$ es producida por diferentes estirpes celulares en la articulación reumática, macrófagos, fibroblastos sinoviales y condrocitos (Okamoto et al., 1997). La $IL-6$ contribuye al mantenimiento de la autoinmunidad a través de modular a las células B y la diferenciación de las células colaboradoras Th17 (Alves et al., 2016). Recientemente se demostró que $IL-6$ induce la diferenciación de osteoclastos a través de estimular y de inhibir la producción de

RANKL y de OPG, respectivamente, por las células osteoblásticas (Hashizume y Mihara, 2011). Estudios *in vitro* muestran que el bloqueo del receptor de IL-6 reduce la formación de osteoclastos en presencia de RANKL o RANKL y TNF α (Axmann et al., 2009). La sobre-expresión de IL-6 induce osteopenia y resulta en alteraciones severas en la microarquitectura del hueso trabecular y cortical. Por otra parte, el ratón deficiente de IL-6 se protege de la inducción de artritis y la erosión ósea (Boe et al., 1999).

La IL-17 es producida por células colaboradoras Th17 y por otras estirpes celulares como condrocitos, fibroblastos sinoviales, macrófagos y células óseas. Esta citocina induce la secreción de citocinas proinflamatorias (es decir, TNF- α , IL-1 β e IL-6) contribuyendo a perpetuar la inflamación a través de incrementar sinérgicamente la actividad de dichas citocinas (Fossiez et al., 1996). Adicionalmente, IL-17 contribuye a la erosión extensa del cartílago y del hueso directa e indirectamente. Las células Th17 expresan RANKL y tienen la capacidad de activar la diferenciación de osteoclastos al interactuar directamente con el receptor RANK en células precursoras o actuar induciendo la expresión de RANKL y metaloproteasas de matriz en osteoblastos y células sinoviales (Sato et al., 2006). La presencia de IL-17 en el fluido sinovial de pacientes con AR correlaciona con el grado de inflamación y denota la importancia de esta citocina en la destrucción de la articulación (Zizzo et al., 2011). Los estudios en modelos animales, muestran enfoques terapéuticos utilizando anticuerpos anti-IL17 que reducen la inflamación de la articulación y la expresión de citocinas pro-inflamatorias y RANKL (Bush et al., 2002).

Por lo que respecta a las citocinas anti-inflamatorias, se ha descrito que la IL-10, IL-13 y TGF- β se encuentran también en concentraciones elevadas en las articulaciones de pacientes con RA. Sin embargo, dichos niveles son insuficientes para neutralizar los efectos deletéreos de las citocinas pro-inflamatorias (Isomaki y Punnonen, 1997).

II.3.3 Patogénesis: estudio de la inflamación y erosión ósea en modelos animales

Los modelos animales han contribuido a entender los mecanismos básicos relacionados al desarrollo de inflamación y la consecuente erosión ósea, permitiendo la identificación de posibles blancos terapéuticos. Se han desarrollado numerosos modelos en los que la artritis es inducida a través de diferentes estímulos. Esto incluye la generación de auto-inmunidad hacia componentes del cartílago e inducción inespecífica de la autoinmunidad con adyuvantes y otros desencadenantes como agentes exógenos, tales como bacterias y virus. Recientemente, se ha añadido la manipulación genética de factores esenciales para el desarrollo del padecimiento (van den Berg, 2009). La amplia variedad de agentes que pueden inducir artritis experimental con características semejantes a las artritis humanas sugiere que pueden existir diversas vías etiológicas desencadenantes de la AR. Sin embargo, ningún modelo animal único mimetiza a la AR humana en toda su complejidad. No obstante, representan diversos aspectos de la patología que pueden utilizarse como herramientas para estudiar componentes particulares (Alves et al., 2016).

Desde una perspectiva histórica, los modelos más ampliamente estudiados son la artritis inducida por adyuvante (AIA) y la artritis inducida por colágeno (CIA). Estos modelos son ejemplos clásicos de los elementos que estimulan el desarrollo de inflamación: inmunidad no específica, auto-inmunidad dirigida al cartílago, inflamación sistémica y dependencia de la activación/función de células T (van den Berg, 2009). La presencia de inflamación sinovial, erosión del hueso y cartílago, dolor concomitante en las articulaciones y, en última instancia, parálisis son características comunes en los modelos. Siendo la pérdida ósea un importante problema sin resolver en la AR, dadas las complicaciones esqueléticas locales y sistémicas (Jones et al., 2002). A continuación se presenta brevemente una descripción de los modelos estudiados en el desarrollo de este proyecto, con particular énfasis en la metodología y las características comunes desarrolladas en los animales que se asemejan a la patología en humanos.

II.3.3.1 Artritis inducida por adyuvante (AIA)

La artritis inducida por el adyuvante completo de Freund (ACF) fue el primer modelo de artritis reumatoide descrito (Freund, 1956). Actualmente, su uso es ampliamente aceptado para estudiar el proceso de inflamación y la caracterización de nuevos agentes terapéuticos para la AR (Bendele, 2001). Este modelo se ha implementado principalmente en la rata ya que el ratón es menos susceptible (Bevaart et al., 2010).

El método consiste en la inyección intradérmica de ACF que consiste en una emulsión de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor suspendido en aceite mineral y agua. Para este modelo, generalmente se emplean ratas macho de las cepas Wistar, Lewis o Sprague-Dawley (Freund, 1956; Hegen et al., 2008). La exposición sistémica al ACF afecta de forma particular a las articulaciones, observándose signos de inflamación persistente en la articulación del tobillo entre el día 10 y 15 después de la inyección de ACF. Por lo general, la enfermedad es grave y conduce a la permanente malformación de la articulación con características comparables a las de la AR en humanos (Schopf et al., 2006).

El desencadenamiento de la artritis en el modelo de ACF inicia por la introducción de un antígeno de origen bacteriano. Específicamente, epítopes de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) presentes en la superficie del *Mycobacterium* son reconocidos por células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, lo que resulta en la producción de anticuerpos que son capaces también de interactuar con las proteínas HSP del huésped, predominantes en tejidos de la articulación. Esto ocasiona una reacción autoinmune que se intensifica con la expansión de células T autoreactivas y células B que media la destrucción de la articulación a través de la migración de células del sistema inmunológico hacia la cavidad articular con la subsecuente producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) por las

células activadas y de auto-anticuerpos. El padecimiento que inicia con el desencadenamiento de un proceso inflamatorio se vuelve crónico, debido en parte a que la articulación es un espacio cerrado que facilita la acumulación de células del sistema inmunológico y citocinas pro-inflamatorias (Kannan et al., 2005; Schopf et al., 2006).

II.3.3.2 Artritis mono-articular inducida por adyuvante (MAIA)

La artritis mono-articular inducida por adyuvante, es una variante del modelo AIA. Este modelo evoca una inflamación unilateral en la articulación inmunizada y se genera a través inyecciones intra-articulares repetidas de 5 µg de adyuvante completo de Freund (ACF) una vez cada 7 días, durante 28 días (Donaldson et al., 1993).

El modelo exhibe características patológicas asociadas a una condición artrítica. En contraste con los modelos de poliartritis, este tipo de artritis queda confinado a la articulación inyectada, permitiendo comparar los cambios bioquímicos y estructurales de la articulación inflamada con la articulación contra-lateral normal. Las características que se observan son un incremento en el diámetro de la articulación de la rodilla comparado con la articulación contra-lateral. Asimismo, a nivel histológico el modelo presenta hipertrofia de la membrana sinovial e infiltración de células inmunes a la cavidad articular, características similares a la AR humana. La inyección de ACF genera inflamación sostenida y duradera durante 28 días, y dadas las características de inflamación restrictivas a la articulación inyectada, apoya su utilidad en el análisis de inflamación en cepas como C57BL6, utilizada generalmente como fondo genético para la generación de animales transgénicos. Una fase inicial de inflamación aguda ocurre después de la primera inyección, evocando una recaída en la inflamación que se resuelve dentro de los siguientes 7 días posteriores a la primera inyección. Sin embargo, con las inyecciones subsecuentes se establece un cuadro de inflamación crónica (Gauldie et al., 2004).

II.4 Prolactina (PRL)

II.4.1 Estructura y función

La PRL es una hormona polipeptídica que regula una gran variedad de funciones asociadas con la reproducción, la osmoregulación, el crecimiento, el metabolismo, inmunoregulación, la función cerebral y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998; Costanza et al., 2015). La PRL se encuentra conservada en vertebrados, y está codificada por un único gen conservado en vertebrados (localizado en el cromosoma 6 en humanos) que tiene aproximadamente 10 kb y está compuesto por 5 exones y 4 intrones (Truong et al., 1984). Posterior a la escisión del péptido señal de 28 aminoácidos, se produce una proteína 199 aminoácidos y 23 KDa de masa molecular (Freeman et al., 2000). La PRL es miembro de la familia de citocinas hematopoyéticas y al igual que otros miembros de esta familia, presenta una estructura tridimensional que consta de cuatro α -hélices dispuestas en forma anti-paralela unidas por asas flexibles (Horseman y Yu-Lee, 1994).

La PRL se produce por los lactotropos en la hipófisis anterior, bajo el control hipotalámico predominantemente de tipo inhibitorio. La dopamina es el principal regulador inhibitorio de la secreción de la PRL, este tono inhibitorio es ejercido sobre los receptores D2 de dopamina en la superficie de las células lactotróficas (Grattan y Kokay, 2008). La síntesis de PRL ha sido demostrada en los tejidos extra-pituitarios y su receptor tiene una expresión ubicua (Bole-Feysot et al., 1998; Ben-Jonathan et al., 2006). Los principales sitios de producción extra-hipofisiaria de la PRL son la decidua, la glándula mamaria, el ovario, la próstata, los testículos y el cerebro (Ben-Jonathan et al., 1996). Otras fuentes identificadas son los tejidos articulares. La PRL está presente en el líquido sinovial (Ogueta et al., 2002) y se produce en cartílago (Macotella et al., 2006), el endotelio vascular (Clapp et al., 1998), los sinoviocitos (Nagafuchi et al., 1999) y las células inmunes (Montgomery, 2001). Por lo tanto, la PRL puede actuar como factor endócrino o local

(parácrino o autocrino). Sin embargo, poco se sabe del papel fisiológico de la PRL producida localmente comparado con el efecto generalmente atribuido a la PRL sistémica de origen hipofisiario.

II.4.2 Receptor de PRL (PRLR): mecanismo de acción y vías de señalización

El receptor de PRL (PRLR) es una proteína con un solo cruce de la membrana plasmática, desprovisto de actividad enzimática intrínseca. Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas hematopoyéticas de clase I (Kelly et al., 1991). Existen tres isoformas del PRLR descritas en rata: la forma corta (291 aminoácidos), la forma intermedia (393 aminoácidos) y la forma larga (591 aminoácidos) (Bole-Feysot et al., 1998). El PRLR se expresa en la mayoría de los tejidos, principalmente en el hígado, la glándula mamaria, la glándula suprarrenal y el hipotálamo. La expresión del PRLR podría alterarse en respuesta a los cambios en la circulación de PRL y las hormonas esteroides (Bernichtein et al., 2010). La PRL actúa sobre las células uniéndose a su receptor pre-dimerizado en la membrana plasmática induciendo cambios conformacionales que inician la señalización intracelular (Goffin y Touraine, 2015). La unión de PRL a su receptor activa diversas cinasas incluyendo las cinasas de Janus (principalmente JAK2) y transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT, principalmente STAT5, STAT1 y STAT3), la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / AKT y la vía de la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK) (Bole-Feysot et al., 1998). La unión de PRL a su receptor induce la fosforilación en residuos de tirosina y la consecuente activación de la cinasa de JAK2, que en su forma activa fosforila residuos de tirosina en el PRLR permitiendo la generación de sitios de anclaje para STAT, que por consiguiente son fosforiladas y activadas por JAK2. Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo para activar la transcripción de moléculas que darán lugar a eventos (Goffin y Touraine, 2015) moleculares como la proliferación (Dominguez-Caceres et al., 2004), diferenciación (Ogueta et al., 2002) y supervivencia celular (Zermeno et al., 2006).

II.4.3 Efectos de la PRL en el tejido óseo

Se desconoce el supuesto papel de la PRL en las células óseas y el metabolismo óseo. Sin embargo, estudios de expresión en tejidos humanos y tejidos murinos han demostrado la presencia del transcrito de PRLR durante el desarrollo fetal humano con inmunoreactividad específica en tejidos esqueléticos (Freemark et al., 1997). Consistentemente, los transcritos del PRLR se han detectado en osteoblastos fetales humanos (hFOB 1.19), células de osteosarcoma humano (MG63 y Saos-2), y osteoblastos aislados de rata (Bataille-Simoneau et al., 1996; Coss et al., 2000; Seriwatanachai et al., 2008; Seriwatanachai et al., 2008), pero se reportaron ausentes en células murinas tipo osteoclastos (Clement-Lacroix et al., 1999).

Se ha descrito que la PRL puede actuar a través de su receptor en el tejido óseo. El tratamiento de osteoblastos aislados de rata adulta con concentraciones altas de PRL (1000 ng/ml) disminuye la expresión de Runx2 y osteocalcina e incrementa la relación RANKL/OPG sin efectos sobre la mineralización (Charoenphandhu et al., 2008). En contraste, cuando las mismas concentraciones son utilizadas para tratar osteoblastos fetales, la expresión de Runx2 y osteocalcina se incrementan, reduciéndose la relación RANKL/OPG (Seriwatanachai et al., 2008). Estos efectos sugieren, una acción estimuladora de PRL sobre la formación de hueso, así como posibles acciones supresoras sobre la resorción. Asimismo, parecen demostrar que la PRL es necesaria para la función osteoblástica durante el desarrollo. No obstante, la PRL podría jugar un papel modulador bifásico. Se ha demostrado que la PRL incrementa la formación de hueso y el contenido de calcio en ratas durante el crecimiento (Krishnamra y Cheeveewattana, 1994), mientras que en ratas sexualmente maduras, gestantes y lactantes estimula la resorción de hueso y el recambio de calcio (Krishnamra y Seemoung, 1996; Lotinun et al., 1998). La inhibición de la secreción de PRL a través de la administración de bromocriptina resulta en mayor volumen óseo y reducida resorción ósea en ratas lactantes (Lotinun et al., 2003).

Por otra parte, los condrocitos son blancos celulares de la PRL. Estas células producen PRL y el cartílago articular expresa el mRNA del PRLR (Coss et al., 2000; Macotella et al., 2006). Adicionalmente, las células humanas progenitoras de condrocitos expresan el PRLR y la PRL estimula su proliferación y diferenciación a condrocitos *in vitro* (Ogueta et al., 2002). Consistentemente con estos hallazgos, la PRL inhibe la apoptosis de condrocitos aislados de ratas postpuberales (Zermeno et al., 2006), sugiriendo que esta hormona puede contribuir a la regulación y el mantenimiento del cartílago.

II.4.3 Efectos de la PRL en el sistema inmune

El papel inmunomodulador de la PRL fue descubierto en aves y ratones mediante la manipulación *in vivo* de las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Berczi et al., 1981), reportando que la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas se restauraba administrando hormona del crecimiento (GH), lactógeno placentario (PL) o PRL (Nagy y Berczi, 1978). Estudios subsecuentes demostraron que la PRL mantiene la inmunocompetencia y promueve la proliferación y supervivencia de linfocitos T, B y natural killer (NK) (Matera et al., 1992). Además, estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la secreción de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-2 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en esplenocitos (Yu-Lee, 1997; Dogusan et al., 2001).

La PRL puede regular la respuesta inmune celular y humoral a través de receptores específicos situados en órganos y células inmunes. EL PRLR ha sido identificado en linfocitos T, B, NK y monocitos (Yu-Lee, 1997) así como en macrófagos y células dendríticas (Carreno et al., 2004). La versatilidad de las acciones de la PRL, ha permitido que sea considerada como una citocina con efectos inmunoreguladores locales. De hecho la PRL es sintetizada por múltiples tipos celulares del sistema inmune (Montgomery, 2001) donde actúa junto con otras citocinas para producir efectos aditivos sinérgicos o antagonizar mutuamente sus acciones (Cesano et al., 1994; Matera et al.,

2000) Además, la PRL y su receptor comparten características estructurales y funcionales con miembros de la superfamilia de citocinas hematopoyéticas (que incluyen a las interleucinas 2, 4 y 6, entre otras) (Mendez et al., 2005).

Las acciones de la PRL pueden traducirse en efectos pro-inflamatorios en diversos órganos. Por ejemplo, se encontró que ratones transgénicos que sobre-expresan a la PRL desarrollan hipertrofia de la próstata (Wennbo et al., 1997) y que el tratamiento con PRL promueve la hiperplasia y la inflamación de este órgano (Leav et al., 1999). No obstante, también se ha reportado que la PRL puede ejercer efectos anti-inflamatorios. Por ejemplo, se mostró que la PRL inhibe la expresión de citocinas en el hígado después de una hemorragia (Zhu et al., 1996) e incrementa la muerte por sepsis en el ratón (Oberbeck et al., 2003). Además, la PRL bloquea el efecto de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IFN- γ , y TNF- α) sobre la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2003) y estimula la síntesis de IL-10, una citocina anti-inflamatoria, en leucocitos de sangre periférica (Brand et al., 2004).

Se ha propuesto que las acciones opuestas de la PRL sobre el proceso inflamatorio pudieran asociarse a su concentración (Ben-Jonathan et al., 1996). Por ejemplo, en contraste con la acción promotora de la actividad de las células NK que la PRL ejerce a concentraciones bajas (<25 ng/ml), concentraciones altas de PRL (>100 ng/ml), comparables a las alcanzadas en el embarazo, lactancia o bajo condiciones de estrés, muestran una clara actividad inhibitoria sobre el desarrollo, la actividad y la proliferación de las células NK (Matera et al., 1992). En este contexto, se conoce que estados de hiperprolactinemia, desde moderada (>30 ng/ml) a alta (>100 ng/ml), pueden tener lugar en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso generalizado (LEG), la AR y esclerosis múltiple (EM) (Orbach y Shoenfeld, 2007).

II.5 Implicaciones de la PRL en la AR: evidencias clínicas y experimentales

El papel de la PRL en la AR fue motivo de una revisión de nuestro grupo (Clapp et al., 2016). El interés por analizar la posible relación entre trastornos autoinmunes y PRL se debe principalmente al hecho de que estos trastornos son más frecuentes en las mujeres que en los hombres (Whitacre, 2001) y los niveles de PRL son más altos en mujeres que en hombres (Ben-Jonathan et al., 2008). Además, en enfermedades autoinmunes como AR, LEG y EM se ha reportado un incremento en los niveles de PRL en algunos pacientes (6% a 45%, dependiendo del tipo de enfermedad y del estudio respectivo) (Jara et al., 1991; Orbach y Shoenfeld, 2007; Shelly et al., 2012; Zhornitsky et al., 2013). Sin embargo, el tratamiento con agonistas dopaminérgicos de los receptores tipo D2 que inhiben la secreción hipofisiaria de PRL, se ha asociado tanto con una mejoría en el padecimiento como con una ausencia de efecto (Erb et al., 2001; Chuang y Molitch, 2007). Estudios clínicos en pacientes con AR y EM, no han logrado demostrar una correlación clara entre niveles altos de PRL en la circulación y la progresión del padecimiento (Orbach y Shoenfeld, 2007); y la lactancia, una condición fisiológica de hiperprolactinemia, se asocia con un agravamiento de la AR (Barrett et al., 2000) pero también con un menor riesgo de presentar este padecimiento en las mujeres no artríticas (Karlson et al., 2004; Pikwer et al., 2009). De manera que la posible participación de la PRL en la patofisiología de las enfermedades autoinmunes y en particular de la AR no es clara y requiere ser estudiada a mayor profundidad.

Por otra parte, los estudios utilizando el modelo AIA en rata han descrito la participación de la PRL en la AR. En donde se le ha atribuido un efecto causal en el desarrollo de la patología, al menos de forma parcial (Berczi y Nagy, 1982). Los animales hipofisectomizados no desarrollan AIA, a menos de que se traten con PRL, y el tratamiento de animales artríticos con bromocriptina reduce la hinchazón articular (Neidhart y Fluckiger, 1992). Mientras que, la hiperprolactinemia inducida por trasplantes hipofisarios en la cápsula adrenal incrementa la severidad de la artritis. No obstante, la

deficiencia adrenocortical debido a la hipofisectomía, podría enmascarar los efectos protectores de la PRL (Clapp et al., 2016). Recientemente se demostró el efecto protector de la PRL en modelo de AIA. En este estudio se demostró que la hiperprolactinemia inducida por haloperidol o infusión de PRL reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias, ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$, $IL-6$) y la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en tejidos articulares. Además, el tratamiento con PRL disminuyó la apoptosis de los condrocitos, la formación de pannus, la inflamación y el dolor articular (Adan et al., 2013). No obstante, en contra de los efectos protectores de PRL diferentes estudios han descrito lo opuesto. El tratamiento de PRL incrementó la progresión de la artritis inducida por colágena, cuando se administró durante la fase de inmunización, reportando también exacerbación del padecimiento por el tratamiento con bromocriptina en etapas tardías del modelo (Mattsson et al., 1992). Adicionalmente, la PRL estimula la proliferación y producción de $IL-6$, $IL-8$ y $MMP-3$ en células sinoviales aisladas de tejidos de pacientes con AR (Nagafuchi et al., 1999). Esto sugiere que las variaciones en las condiciones experimentales pueden dar lugar a las discrepancias aquí mostradas, con efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios de la PRL.

III. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se investigó la participación de la PRL sobre la inflamación sinovial articular y la progresiva erosión del hueso en la artritis inflamatoria experimental. La identificación de factores involucrados en el desarrollo de la inflamación y destrucción ósea tiene relevancia en el control de la progresión y las alteraciones estructurales de la articulación en la AR y puede conducir al descubrimiento de nuevas opciones terapéuticas. En este trabajo demostramos que la PRL regula negativamente la inflamación sinovial articular, la consecuente erosión ósea y el incremento de osteoclastogénesis lo que apoya su potencial terapéutico contra la AR y otras artritis inflamatorias, así como en padecimientos asociados con la destrucción del hueso

IV. HIPÓTESIS

La prolactina reduce la inflamación de la articulación y la destrucción del hueso en la artritis inflamatoria experimental a través de efectos sobre los fibroblastos sinoviales que involucran al sistema RANKL/RANK.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si la administración de PRL o la delección genética de su receptor modifican la inflamación articular, la erosión del hueso y la osteoclastogénesis en la artritis inflamatoria experimental vía acciones sobre el sistema RANKL/RANK y si sus efectos incluyen acciones sobre fibroblastos sinoviales.

Objetivos Específicos

- a. Determinar si la administración exógena de PRL previene contra la inflamación de la articulación en la artritis experimental.
- b. Evaluar si la hiperprolactinemia reduce la erosión del hueso articular y la osteoclastogénesis en la artritis inflamatoria experimental.
- c. Valorar el desarrollo de artritis inflamatoria experimental en ratones genéticamente deficientes del receptor de PRL.
- d. Determinar si la delección genética del receptor de PRL promueve la inflamación articular, la erosión del hueso y la osteoclastogénesis en la artritis inflamatoria experimental.
- e. Evaluar efectos de la PRL sobre la expresión de citocinas proinflamatorias y el sistema RANKL/RANK en fibroblastos sinoviales en cultivo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (200-250 g de peso corporal) y ratones hembras C57BL6 genéticamente deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) (8 semanas de edad, 20-25 g) a los que se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* bajo condiciones estándar: temperatura controlada (22±1 °C) con ciclos de luz oscuridad 12:12. Los animales se conservaron y manipularon de acuerdo con la Guía para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NIH, 2011). Los protocolos experimentales fueron autorizados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

VI.2 Inducción de artritis por el ACF en la rata (AIA)

El método consistió en realizar una inyección intradérmica en la parte dorsal de la cola, de 0.2 ml de adyuvante completo de Freund's (ACF, Difco Laboratories, Detroit, MI; 10 mg *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor en 1 ml de adyuvante incompleto de Freund's). El desarrollo de artritis se monitoreó como el incremento en la circunferencia de la articulación del tobillo, cuantificada cada 3 días utilizando dos diámetros perpendiculares como referencia; latero-lateral (a) y antero-posterior, y la fórmula de circunferencia: $2\pi(\sqrt{(a^2+b^2)}/2)$. El número de evaluaciones realizadas se consideró en relación con el día de la inducción (designado como día 0). Los animales se dividieron aleatoriamente para formar cuatro grupos experimentales: el grupo no tratado (Control), el grupo tratado con PRL, el grupo con artritis inducida por adyuvante completo de Freund's (AIA) y el grupo con artritis inducida por adyuvante completo de Freund's tratado con PRL (AIA+PRL). El día 21 post-inmunización los animales se sacrificaron por decapitación con previa anestesia en una atmósfera saturada de CO₂. Se colectó suero y se extrajeron las articulaciones del tobillo para realizar las evaluaciones correspondientes.

VI.3 Inducción de hiperprolactinemia

Los animales fueron tratados con una infusión continua de PRL ovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) utilizando bombas osmóticas (Alzet mod. 1004, 28 días, Alza Corp., Palo Alto, CA) implantadas subcutáneamente mediante una incisión en el dorso bajo anestesia (70% de ketamina y 30% de xilacina, 1 $\mu\text{l}/\text{g}$ de peso corporal, i.p.). Los animales del grupo tratado únicamente con PRL y el grupo AIA+PRL recibieron el implante 3 días antes de la inducción de artritis.

VI.4 Inducción de artritis monoarticular en el ratón (MAIA)

La inducción de artritis monoarticular consistió en inyecciones repetidas de ACF (5 μg in 10 μl) en el espacio intra-articular de la articulación tibio-femoral durante 18 días (administrándose dosis repetidas cada 7 días). Se determinó la circunferencia de las articulaciones tibio-femorales como parámetro de inflamación. Los animales fueron sacrificados 18 días después de la inyección inicial de ACF. Se colectó suero y se extrajeron las articulaciones del tobillo para evaluaciones posteriores.

VI.5 Inyección intra-articular de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and $\text{IFN}\gamma$ (Cyt)

Los ratones fueron inyectados en el espacio intra-articular de la articulación tibio-femoral con Cyt en un volumen final de 20 μl (62.5 ng $\text{TNF}\alpha$, 25 ng $\text{IL-1}\beta$, and 25 ng $\text{IFN}\gamma$; R&D Systems, Minneapolis, MN) o vehículo (H_2O libre de endotoxinas). Después de 48 h de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se disectaron las membranas sinoviales de la cavidad articular. Los tejidos fueron mantenidos a -70°C hasta su procesamiento.

VI.6 Determinación de los niveles circulantes de PRL

Los niveles de PRL en suero se determinaron por medio del bioensayo de Nb2, un procedimiento estándar, previamente descrito (Tanaka et al., 1980). El ensayo se basa en la respuesta proliferativa de células Nb2 de linfoma de rata a PRL.

VI.7 Determinación de los niveles circulantes de proteína C-reactiva y TNF α

Los niveles circulantes de proteína C-reactiva y TNF α se cuantificaron utilizando kits de ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA; R&D systems, Minneapolis, MN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

VI.8 Análisis histopatológico de la articulación

Se disectaron las articulaciones del tobillo y rodilla y se fijaron en formalina 10% durante 3 días. Posteriormente, las articulaciones fueron descalcificadas, deshidratadas y embebidas en parafina. Se realizaron cortes seriados de 7 μ m y se tiñeron con hematoxilina de Harris para cuantificar el área de hueso trabecular y con la fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP) para evaluar el número de osteoclastos. Las muestras se lavaron e incubaron durante 3 h a 37°C en un buffer de tinción [Fast Red Violet LB Salt (80 mg; Sigma Aldrich), Naphtol AS-MX (40 mg; Sigma Aldrich), formamida (4 ml; Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.04 M acetato de sodio (0.656 g), 0.2 M tartrato de sodio dihidratado (9.2 g), and agua destilada (200 ml)]. El pH de la solución se ajustó a 5.0 y se pre-incubó a 37°C. Después de la incubación, las muestras se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich) y se cubrieron con medio de montaje (Entellan, Merck Millipore Corporation, Billeria, MA). Las secciones de tejido se visualizaron bajo microscopia de luz (Olympus BX60F5, Olympus Tokyo, Japan). La superficie de hueso trabecular y el número de células TRAP positivas (osteoclastos) se cuantificaron (Image-Pro Plus analysis software; Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se dividieron por el área total de hueso para obtener el área de hueso trabecular y la densidad de osteoclastos. Las evaluaciones fueron realizadas por dos observadores independientes.

VI.9 qRT-PCR

Las articulaciones extraídas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Posteriormente, la articulación completa (hueso, cartílago, músculo) se pulverizó en mortero con pistilo.

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se retrotranscribió a cDNA utilizando el the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de PCR se detectaron y cuantificaron utilizando Maxima SYBR Green q PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en un reacción final de 10 μ l conteniendo templado y 0.5 uM de cada par de oligonucleótidos para diferentes genes (**Tabla 1**). La amplificación se llevó a cabo en el equipo CFX96 real time PCR detection system (Bio-Rad, Richmond, CA) con el siguiente protocolo: un ciclo de 10 min de desnaturalización a 95° C y 35 ciclos de amplificación (10 seg a 95 °C, 30 seg a la temperatura específica de cada par de oligonucleótidos y 30 seg a 72°C). La expresión relativa del mRNA se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y normalizada al gen constitutivo, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*Hprt*).

VI.10 Aislamiento y cultivo de fibroblastos sinoviales

Los fibroblastos sinoviales se aislaron de las extremidades inferiores de animales silvestres como se describió previamente (Armaka et al., 2009). Brevemente, las extremidades (fémur/fibula/tibia) se lavaron en una solución salina de Hanks y se disectaron inmersas en medio de cultivo DMEM alta glucosa suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; Gibco, Grand Island, NY) y antibióticos (50U/ml de penicilina y 50 ug/ml de estreptomina; Invitrogen) para remover los tejidos blandos de los huesos. El espacio articular se disectó para exponer los tejidos sinoviales y se incubó en DMEM conteniendo 1m/ml de colagenasa tipo IV (Difco, Laboratories) y 0.1 mg /ml de desoxirribonucleasa I (Sigma Aldrich) en rotación durante 3 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación los tejidos se vortexearon vigorosamente para liberar las células. El sobrenadante se filtró utilizando una malla de 80 μ m y se centrifugó 1500 rpm 5 min. El pellet se resuspendió en medio de cultivo fresco y las células se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se utilizaron células de pases 2-4, cuando los cultivos mostraron un fenotipo de sinoviocito tipo fibroblasto >98% (CD90.2+, VCAM1+, and ICAM-1+) como se describió previamente. Los

fibroblastos sinoviales se sembraron a una confluencia de 10⁶ células/ pozo en placas de 6 pozos y se pre-incubaron en 2 ml de medio de cultivo durante 16 h con y sin PRL (100 nM, PRL recombinante humana proporcionada por Michael E., Hodsdon, Yale University, New Haven, CT). Transcurrido el periodo de pre-incubación las células se trataron con y sin una mezcla de citocinas (Cyt: 0.25 ng/ml TNF α , 0.05 ng/ml IL-1 β , and 0.05 ng/ml IFN γ) por un periodo de 24 h. Otros cultivos celulares fueron pre-incubados durante 2 h con y sin 50 μ M de S32-201, inhibidor de STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e incubado posteriormente o no en presencia de 100 nM de PRL durante 16 h, seguido del tratamiento con y sin Cyt durante 24 h. Para evaluar los efectos de PRL sobre la fosforilación/activación de STAT3, se sembraron fibroblastos sinoviales en medio completo (DMEM+20% FBS) durante 24 h, y cultivados posteriormente en medio de cultivo libre de suero por 24 h adicionales para pre-tratarse durante 6 h con Cyt seguido de una incubación de 30 min en presencia o ausencia de Cyt, con y sin 100 nM de PRL.

VI.11 Co-cultivo de fibroblastos sinoviales y progenitores de osteoclastos

Se utilizaron fibroblastos sinoviales de pase 4 que fueron sembraron a una confluencia de 5x10⁵ células en placas de 48 pozos. Después de 12 h, las células se trataron o no con PRL durante 16 h. Posteriormente las células se trataron o no con Cyt y transcurridas 24 h, células aisladas de la medula ósea (2x10⁹ células) conteniendo progenitores de osteoclastos cosechadas de tibias y fémures de ratones C57BL/6 se adicionaron al cultivo de fibroblastos en medio de cultivo conteniendo 1,25-dihidroxi-vitamina-D3 (10⁻⁸ M, Sigma-Aldrich). El co-cultivo se incubó durante 10 días y se reemplazó el medio por medio fresco (conteniendo 1,25-dihidroxi-vitamina-D3, +/- Cyt, +/- PRL) cada dos días. Transcurridos los 10 días, las células se fijaron con formaldehído al 3.7% durante 10 min a T.A., se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 20 min a 37 °C en buffer de tinción TRAP. La osteoclastogénesis se evaluó determinando el número de células TRAP positivas.

VI.12 Western blot

Las muestras de tejido articular pulverizado o fibroblastos sinoviales se resuspendieron en buffer de lisis (0.1 M Tris-HCL, 0.2 M EGTA, 0.2 M EDTA, 100 mM ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio, 100 mM pirofosfato ácido de sodio, 250 mM sucrosa, pH 7.5). Se separaron por electroforesis SDS/PAGE 60 ug de proteína total, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron durante toda la noche en los siguientes anticuerpos primarios: 1:1000 anti-PRL receptor (sc-300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:250 anti-phospho STAT3 (Tyrosine 705) (9131; Cell Signaling, Beverly, MA), 1:250 anti STAT3 (sc-483; Santa Cruz Biotechnology), o 1:1000 anti- β tubulina (ab6046; Abcam, Cambridge, MA). Las membranas se lavaron con PBS/Tween-20 y la detección se realizó utilizando los siguientes anticuerpos secundarios: un anti-IgG de conejo (1:5000) acoplado a fosfatasa alcalina o a peroxidasa (1:10000) (ambos de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). La cuantificación de la densitometría de las proteínas se evaluó con Quantity One software (Bio-Rad, Richmond, CA).

VI.13 Análisis estadístico

La distribución e igualdad de varianzas de las muestras se determinó mediante la prueba D'Agostino-Pearson. Cuando las muestras presentaron una distribución normal con varianzas iguales, las diferencias entre dos grupos se valoraron mediante un análisis t-test y para grupos mayores a tres, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Tukey, considerándose una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$. En el caso de datos con distribución no paramétrica, las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron por Kruskal-Wallis seguido de una prueba post-hoc de Dunn's utilizando Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc., San Jose, CA).

Table 1. Oligonucleótidos. Secuencias utilizadas para la cuantificación de la expresión de mediadores de inflamación para rata y ratón mediante qRT-PCR.

Gen	Secuencia (5'-3')		T Alineamiento (°C)
<i>Hprt</i>	Fw-TTGCTGACCTGCTGGATTAC	Rv-GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2
<i>Tnfa</i>	Fw-GGGCTTGTCACTCGAGTTTT	Rv-TGC CTC AGC CTC TTC TCA TT	59.4
<i>Il1b</i>	Fw-AAAAGCGGTTTGTCTTCAAC	Rv-GGAATAGTGCAGCCATCTTT	59.4
<i>Il6</i>	Fw-TCCAACCTCATCTTGAAGCA	Rv-TTCATATTGCCAGTTCCTCG	59.4
<i>Acp5</i>	Fw-ATTATGGGCGCTGACTTCAT	Rv-AATTTGTGCCGAGACATTGC	59.1
<i>rMmp9</i>	Fw-ACTAAGGCTCCTCTTTTGT	Rv-ATTGGTTCGAGTAGCTGGTA	56.2
<i>rCtsk</i>	Fw-GGGCAGGATGAAAGTTGTAT	Rv-ATTATCACGGTCGCAGTTTT	53.7
<i>rTnfrsf11</i>	Fw-TCGTTAAAACCAGCATCAAA	Rv-TCCTCCAACGTTTATGGAAT	53.7
<i>rTnfrsf11a</i>	Fw-TCGTTAAAACCAGCATCAAA	Rv-TCCTCCAACGTTTATGGAAT	56.2
<i>rTnfrsf11b</i>	Fw-GTGGAGGATCAAAAATGGAG	Rv-GTTTTGGGAAAGTGGTATGC	58.3
<i>rPrlr Long</i>	Fw-ATCTTCAACATGGCCATTAC	Rv-TTCTTCTCTCCAGTCTCAA	56.2
<i>rPrlr Short</i>	Fw-GACCTGCATCTTCCACCAGT	Rv-AGTCAAGTCCCTGCAT	60.2
<i>rlfng</i>	Fw-AGCACAAAGCTGCAATGAA	Rv-TTCTTCTTATTGGCACACTC	58.2
<i>Il17a</i>	Fw-ATCCATCCATGTGCCTGAT	Rv-TTCAGGTTGACCTTCACGTT	58.3
<i>Il21</i>	Fw-ATCAACGACTTGTGGCACA	Rv-CAAATCACAGGAAGGGCATT	53.3
<i>Il122</i>	Fw-CATCAACTCCCAATGCAAAC	Rv-TTCAAGGGTGAAGTTGAGCA	56.3
<i>Il123</i>	Fw-GCTGGATTGCAGAGCAATAA	Rv-TTGCAAACAGAAGCTGGCTGT	58.4
<i>rFoxp3</i>	Fw-TCCAGAGTTCTCCACAACA	Rv-TTTCATTGAGTGTCTCTGC	58.4
<i>rEbi3</i>	Fw-TCCTTCATTGCCACTTACAG	Rv-AAGTAGGGCACTGTGGAAAA	58.4
<i>Il12a</i>	Fw-TCTTTGATGATGACCCTGTG	Rv-CTGAAGTGTGCATTTATGG	58.4
<i>Il10</i>	Fw-GTCCCCTGCCTTCTTT	Rv-CAGTCAGCCAGACCCACAT	53.3
<i>Tgfb1</i>	Fw-CTTTAGGAAGGACCTGGGTT	Rv-CAGGAGCGCACAAATCATGTT	60.2
<i>mTnfa</i>	Fw-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	Rv-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	60.2
<i>mIl1b</i>	Fw-GTTGATTCAAGGGGACATTA	Rv-AGCTTCAATGAAAGACCTCA	60.2
<i>mIl6</i>	Fw-GAGGATACCACTCCCAACAGACC	Rv-AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	60.2
<i>mMmp9</i>	Fw-CTTTGAGTCCGGCAGACAAT	Rv-TTCCAGTACCAACCGTCTCT	59.1
<i>mCtsk</i>	Fw-AACAGCAAGGTGGATGAAAT	Rv-GCCTCAAGATTATGGACAGA	56.6
<i>m Tnfrsf11</i>	Fw-ACTCCATGAAAACGCAGATT	Rv-CACAATGTGTTGCAGTTCT	60.4
<i>m Tnfrsf11a</i>	Fw-AACGGAATCAGATGTGGTCT	Rv-TACTGCAAGCATCATTGACC	55.1
<i>m Tnfrsf11b</i>	Fw-TGAGTGTGTTTGGTGGACAGT	Rv-TGCTTTCACAGAGGTCAATG	60.4
<i>mPrlr Long</i>	Fw-ACACGCGCAGATCTCCTTACCA	Rv-CCCCTTCTTGCACAGCCACTT	56.2
<i>mlfng</i>	Fw-GCGTCATTGAATCACACCTG	Rv-GACCTGTGGGTTGTTGACCT	60.2
<i>Rora</i>	Fw-ACATATCCAAATCCCACCTG	Rv-TAATCTTGATGGCACACAGC	58.4
<i>Rorc</i>	Fw-CCCTGTGTTTTCTGAGGAT	Rv-ATGATGATGGAAAGCCAGTT	58.4
<i>mIl17a</i>	Fw-GCTATTGATTTTCAGCAAGG	Rv-AAAACAAACACGAAGCAGTT	60.2
<i>mIl21</i>	Fw-GGAGGAAAGAAACAGAAGCA	Rv-CATCTTTTGAAGGAGCCATT	58.4
<i>mIl22</i>	Fw-TGACCAAACTCAGCAATCAG	Rv-TCCACTCTCTCCAAGCTTTT	56.3
<i>mIl23</i>	Fw-AAAATAATGTGCCCGTATC	Rv-GATCCTTTGCAAGCAGAACT	53.3
<i>mFoxp3</i>	Fw-TTCACCTATGCCACCCTTAT	Rv-TGCGAGTAAACCAATGGTAG	58.4
<i>mEbi3</i>	Fw-TCCTTCATTGCCACTTACAG	Rv-ATGATTCGCTCAGCCACAAA	61.2
<i>mIl12a</i>	Fw-TCTTTGATGATGACCCTGTG	Rv-GCTGATGGTTGTGATTCTGA	58.4
<i>mIl10</i>	Fw-AGAAATCAAGGAGCATTGA	Rv-ATTCATGGCCTTGTAGACAC	60.2

Hprt, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; *Tnfa*, factor de necrosis tumoral α ; *Il1b*, Interleucina 1 β ; *Il6*, Interleucina 6; *Acp5*, fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP); *Mmp9*, metaloproteasa de matriz 9; *Ctsk*, *cathepsina K*; *Tnfrsf11*, receptor activador para el factor nuclear κ B; *Tnfrsf11a*, ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B; *Tnfrsf11b*, osteoprotegerina; *Prlr*, receptor de PRL; *lfng*, Interferon γ ; *Il17a*, Interleucina 17A; *Il21*, Interleucina 21; *Il22*, Interleucina 22; *Il23*, Interleucina 23; *Rora*, receptor huérfano relacionado a ácido retinoico alfa; *Rorc*, receptor huérfano relacionado a ácido retinoico gamma; *Foxp3*, Forkhead box P3; *Ebi3*, Epstein-Barr Virus Induced 3; *Il12a*, Interleucina 12a; *Il10*, Interleucina 10; *Tgfb1*, factor de crecimiento transformante beta 1.

VII. RESULTADOS

VII.1 La PRL reduce la inflamación articular y la inflamación sistémica en el modelo de artritis poliarticular inducida por adyuvante (AIA) en la rata

El análisis del efecto protector de la PRL sobre la inflamación de la articulación se llevó a cabo a través de la evaluación de diferentes parámetros de inflamación, como la circunferencia articular y la expresión de moléculas proinflamatorias, confirmándose hallazgos de nuestro trabajo previo (Adan et al., 2013). La infusión crónica de PRL mediante bombas osmóticas resultó en hiperprolactinemia a lo largo del experimento (**Figura 5**). Este incremento en los niveles séricos de PRL se asoció a una reducción de la severidad de la artritis denotada por la disminución de la hinchazón y edema de la articulación (circunferencia de la articulación tibio-tarsal, **Figura 6**) y la reducción de mediadores proinflamatorios, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Ifn γ* (**Figure 7**) al día 21 posterior a la inducción de artritis.

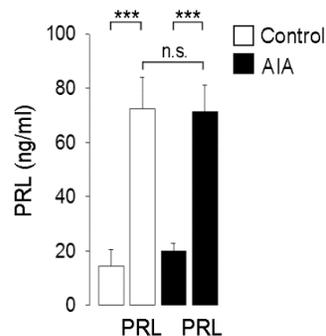


Figura 5. Determinación de los niveles circulantes de PRL. La concentración de PRL se determinó en el suero mediante el bioensayo de Nb2, en animales 21 días después de haber sido inyectados (AIA) o no (Control) con ACF. En ambos grupos, algunos de los animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba osmótica de infusión de PRL 3 días antes de la inducción de AIA. Los valores representan la media \pm EE de 5-8 animales. *** $p < 0.001$, n.s. no-significativo.

Se evaluó la expresión del receptor de PRL (PRLR) a través de determinar la expresión del mRNA de sus isoformas larga y corta en las articulaciones tibio-tarsales de animales artríticos y controles. Encontramos que la artritis eleva la expresión (mRNA y proteína) de la isoforma larga del receptor

de PRL observándose una diferencia significativa al compararse con animales no tratados. La expresión de la isoforma corta de PRLR permaneció sin cambios (**Figura 8**).

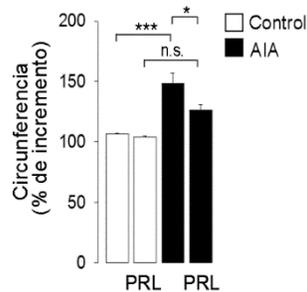


Figura 6. La PRL reduce la inflamación de la articulación tibio-tarsal en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). Se muestra la inflamación de las extremidades posteriores, evaluada por la circunferencia de la articulación tibio-tarsal determinada el día 21 posterior a la inyección del ACF (AIA) o del vehículo (Control). Un grupo de animales recibió un implante subcutáneo de una bomba osmótica de infusión de PRL en ausencia (PRL) o presencia de ACF (AIA+PRL) 3 días antes de la inmunización con el ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s. no-significativo.

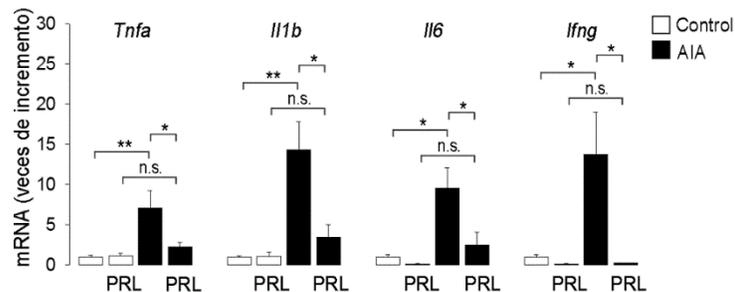


Figura 7. La PRL reduce la expresión de mediadores de inflamación en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). El nivel de expresión de *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Ifng* se determinó en la articulación tibio-tarsal en animales 21 días después de haber sido inmunización con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos de los animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba osmótica de infusión de PRL 3 días antes del ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. no-significativo.

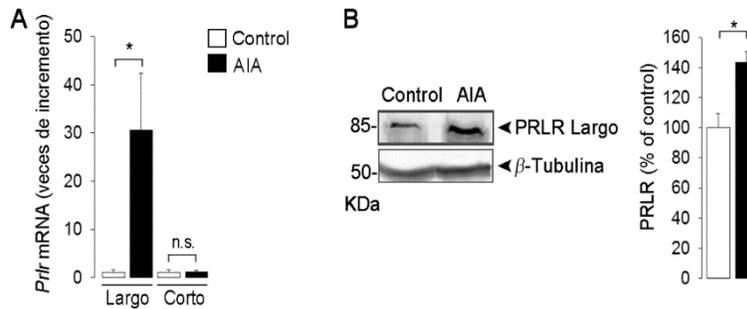


Figura 8. La artritis inducida por adyuvante completo de Freund (AIA) eleva la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en la articulación tibio-tarsal. (A) Se muestra la cuantificación mediante qRT-PCR de la expresión del mRNA de las isoformas larga y corta del receptor de PRL (PRLR) en la articulación tibio-tarsal en animales 21 días después de haber sido inmunizados con el ACF (AIA) o no (Control). Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, n.s. no-significativo. **(B)** Evaluación por Western blot de la isoforma larga del PRLR en lisados proteicos de la articulación tibio-tarsal de animales 21 días después de haber sido inmunizados con el ACF (AIA) o no (Control). Las barras muestran los valores de densitometría del cociente PRLR Largo/ β -Tubulina y se presentan como la media \pm EE de 3 blots independientes. * $p < 0.05$.

Posteriormente, para evaluar el efecto de la PRL sobre la inflamación sistémica se determinaron los niveles circulantes del $TNF\alpha$ y de la proteína C-reactiva (CRP). Estas proteínas se incrementan en respuesta a procesos de inflamación (trauma, sepsis, infección, artritis) y proveen una indicación del grado de inflamación sistémica (Pepys y Hirschfield, 2003; Popa et al., 2007).

Los resultados obtenidos sobre los niveles séricos de $TNF\alpha$ y CRP evaluados el día 21 posterior a la inducción de artritis muestran un incremento en la concentración de ambas proteínas en el suero de animales artríticos que disminuye significativamente por el tratamiento con PRL. No se observaron cambios significativos debidos a PRL en los animales sanos (**Figura 9**). Adicionalmente se determinó el efecto de la PRL sobre la expresión de factores de transcripción y citocinas producidas por células colaboradoras Th17 (**Figura 10**) y células T reguladoras (**Figura 11**). El tratamiento con PRL disminuyó significativamente la expresión de dichos factores de transcripción y citocinas. No se observaron cambios significativos debidos a PRL en la expresión en los animales sanos.

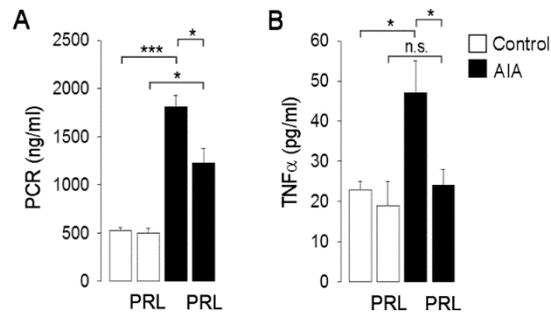


Figura 9. La PRL reduce los niveles circulantes de proteína C-reactiva y TNF α en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). (A) Los niveles séricos de proteína C-reactiva (PCR) y (B) TNF α se determinaron en el suero de animales 21 días después de haber sido inyectados (AIA) o no (Control) con ACF. Un grupo de animales fue implantado subcutáneamente con una bomba osmótica de infusión de PRL 3 días antes de la inmunización (AIA+PRL) o no (PRL) con ACF. Las barras representan la media \pm EE de 5-8 animales. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

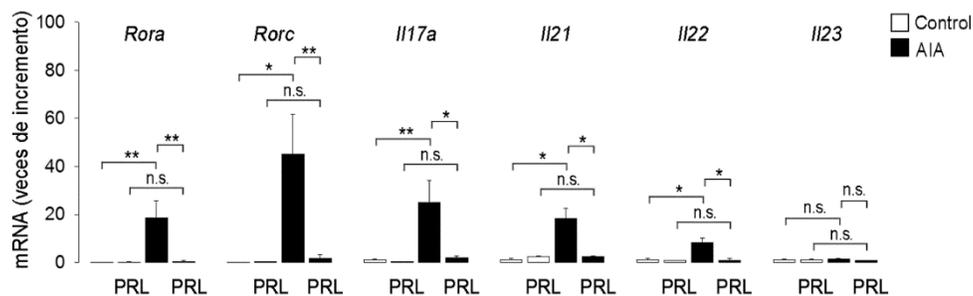


Figura 10. La PRL reduce la expresión de citocinas producidas por células colaboradoras Th17 en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). Se muestra los niveles de expresión de los factores de transcripción (*Rora* y *Rorc*) y citocinas (*Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23*), ambos relacionados a la diferenciación y función de células colaboradoras Th17 y determinados en la articulación tibio-tarsal de animales 21 días después de haber sido inmunizados con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba de infusión de PRL 3 días antes de la inmunización con el ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. no-significativo.

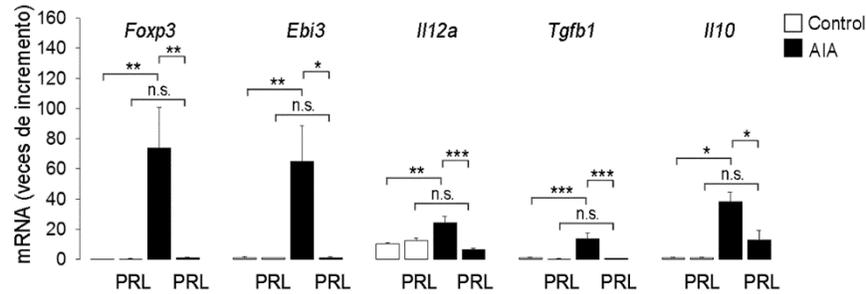


Figura 11. La PRL reduce la expresión de citocinas producidas por células T reguladoras en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). Se muestra los niveles de expresión del factor de transcripción *Foxp3* y citocinas (*Ebi3*, *Il12a*, *Tgfb1* e *Il10*), ambos relacionados a la diferenciación y función de células T reguladoras y evaluados en la articulación tibio-tarsal de animales 21 días después de haber sido inmunizados con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba de infusión de PRL 3 días antes de la inmunización con el ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. no-significativo.

VII.2 La PRL reduce la pérdida de hueso trabecular y la densidad de osteoclastos en la artritis inducida por adyuvante (AIA)

En el sinovio reumático, el incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$) induce la pérdida ósea a través de incrementar la actividad de los osteoclastos (Schett y Gravallese, 2012). Dado que este proceso ocurre en la AR y que la PRL reduce la producción de citocinas determinantes de la AR, se determinó el efecto de la PRL sobre la erosión ósea a través de evaluar el área de hueso trabecular y la densidad de osteoclastos en la articulación tibio-tarsal.

Las articulaciones de animales artríticos presentaron pérdida ósea trabecular ocasionada por la artritis, Mientras que el tratamiento con PRL redujo significativamente esta característica (Figura 12). Asimismo, la marcada densidad de osteoclastos observada en las articulaciones de los animales artríticos disminuyó significativamente por el tratamiento con PRL (Figura 13). En los animales

controles y controles tratados con PRL no se observaron diferencias significativas en estos parámetros de erosión ósea.

De la misma forma, el tratamiento con PRL disminuyó la osteoclastogénesis evaluada a través de la expresión de *Trap*, *Mmp9*, *Ctsk*, *Tnfrs11a* (RANK) (Figura 14) y *Tnfrs11* (RANKL) (Figura 15) factores esenciales para la actividad y diferenciación de osteoclastos, respectivamente. La expresión del receptor soluble OPG (*Tnfrs11b*) no se modificó. No obstante, la PRL redujo la relación RANKL/OPG en las articulaciones artríticas (Figura 15).

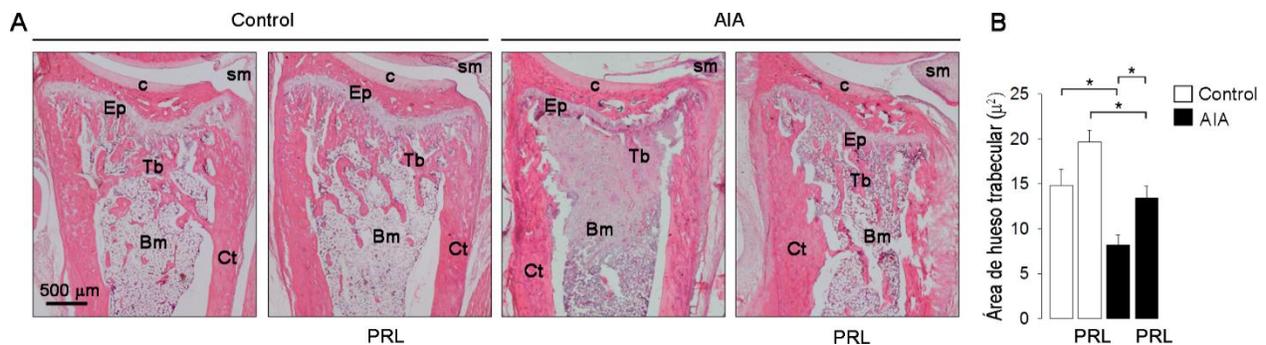


Figura 12. Efecto de la PRL sobre la disminución de hueso trabecular en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de secciones de la articulación tibio-tarsal de la rata, 21 días después de haber sido inmunizados (AIA) o no (Control) con el ACF. En ambos grupos, algunos animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba de infusión de PRL 3días antes de la inmunización con el ACF. **Ep**, placa epifiseal; **Bm**, médula ósea; **Ct**, hueso cortical; **Tb**, hueso trabecular; **c**, cartílago; **sm**, membrana sinovial. (B) Se muestran los valores de la cuantificación del área de hueso trabecular/área total de hueso. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$.

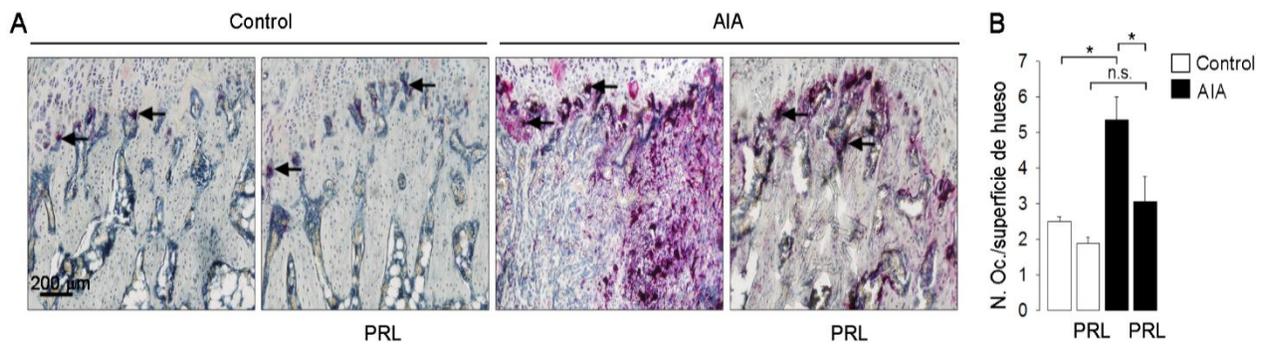


Figura 13. Efecto de la PRL sobre la actividad de osteoclastos en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). (A) Imágenes representativas de la evaluación histológica de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) en secciones de la articulación tibio-tarsal de ratas 21 días después de haber sido inmunizadas con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba de infusión de PRL 3 días antes de la inmunización con el ACF. Las células TRAP (+) son indicadas con flechas. . **Ep**, placa epifiseal; **Bm**, médula ósea; **Ct**, hueso cortical; **Tb**, hueso trabecular; **c**, cartílago; **sm**, membrana sinovial. (B) Se muestran los valores de la cuantificación del número de osteoclastos/superficie de hueso. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, n.s. no-significativo.

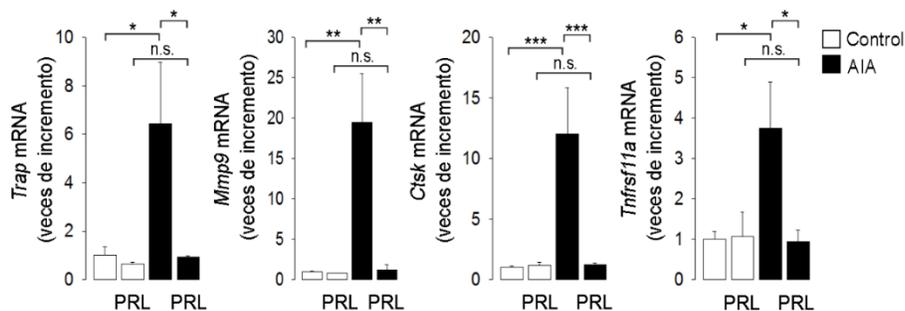


Figura 14. La PRL reduce la expresión de mediadores de erosión ósea en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). El nivel de expresión de *Trap*, *Mmp9*, *Ctsk*, y *Tnfrsf11a* se determinó en la articulación del tobillo en animales 21 días después de haber sido inmunización con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos de los animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba osmótica de infusión de PRL 3 días antes del ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. no-significativo.

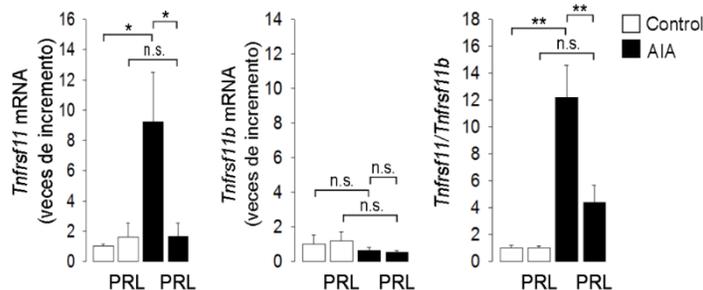


Figura 15. La PRL reduce la expresión de marcadores de osteoclastos en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). El nivel de expresión de *Tnfrsf11*, *Tnfrsf11b* y su respectivo cociente se determinó en la articulación del tobillo en animales 21 días después de haber sido inmunización con el ACF (AIA) o no (Control). En ambos grupos, algunos de los animales fueron implantados subcutáneamente con una bomba osmótica de infusión de PRL 3 días antes del ACF. Los resultados se presentan como la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. no-significativo.

VII.3 La severidad de la artritis inducida por antígeno (MAIA) se incrementa en el ratón deficiente del receptor de PRL

El efecto protector de la PRL contra la inflamación y la osteoclastogénesis en la artritis, se corroboró utilizando el modelo de artritis inducida por antígeno (MAIA) en ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}). Los resultados obtenidos muestran que el ratón *Prlr*^{-/-} desarrolla un mayor grado de inflamación respecto a los animales silvestres determinado a través de la valoración de la circunferencia de la articulación tibio-femoral (**Figura 16**) y la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias (*Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Ifng*) (**Figure 17**) al día 18 posterior a la inducción de artritis. Adicionalmente se determinó la expresión génica de factores de transcripción y citocinas producidas por células colaboradoras Th17 (*Il17a*, *Il21*, *Il22*, *Il23*) (**Figura 18**) y células T reguladoras (*Foxp3*, *Ebi3*, *Il10*) (**Figura 19**). La expresión de estos factores se incrementa significativamente en los animales *Prlr*^{-/-} comparados con su contraparte silvestre (*Prlr*^{+/+}). Nos se observaron cambios significativos en la expresión de *Rora*, *Rorc*, *Il12a* y *Tgfb1*.

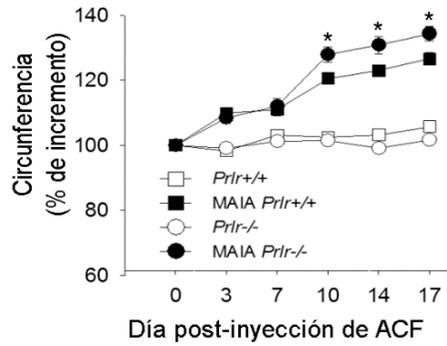


Figura 16. La falta del receptor de PRL produce mayor inflamación de la articulación tibio-femoral en ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). Evaluación del desarrollo de inflamación en ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) determinada por la circunferencia de la articulación tibio-femoral en los días 3, 7, 10, 14 y 17 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Las determinaciones se presentan como la media ± EE de 8-12 animales. *p <0.05.

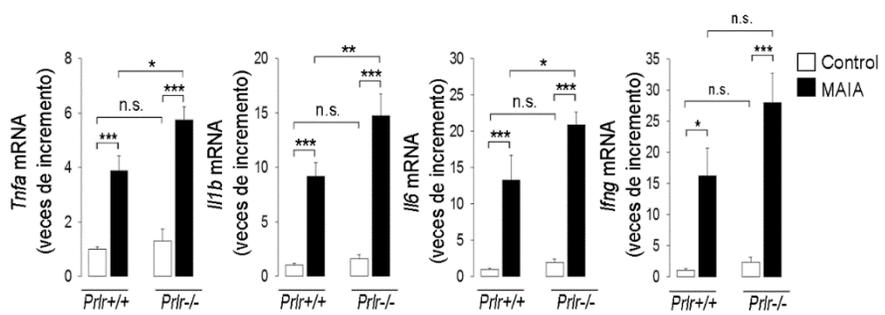


Figura 17. La expresión de mediadores de inflamación se incrementa en la articulación tibio-femoral del ratón deficiente del receptor de PRL sujeto a artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). Se determinó la expresión génica de Tnfa, Il1b, Il6 e Ifng en las articulaciones tibio-femorales de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Los resultados se presentan como la media ± EE de 8-12 animales. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001, n.s. no-significativo.

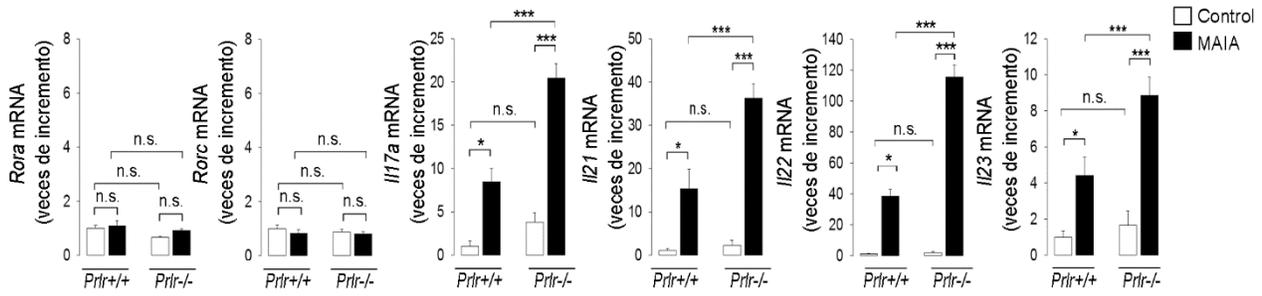


Figura 18. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión de citocinas producidas por células colaboradoras Th17 en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). (A) Se muestran los niveles de expresión del mRNA de los factores de transcripción (*Rora* y *Rorc*) y (B) citocinas (*Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23*) relacionados a la diferenciación y función de células Th17, respectivamente y evaluados en la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Los resultados se presentan como la media ± EE de 8-12 animales. *p <0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no-significativo.

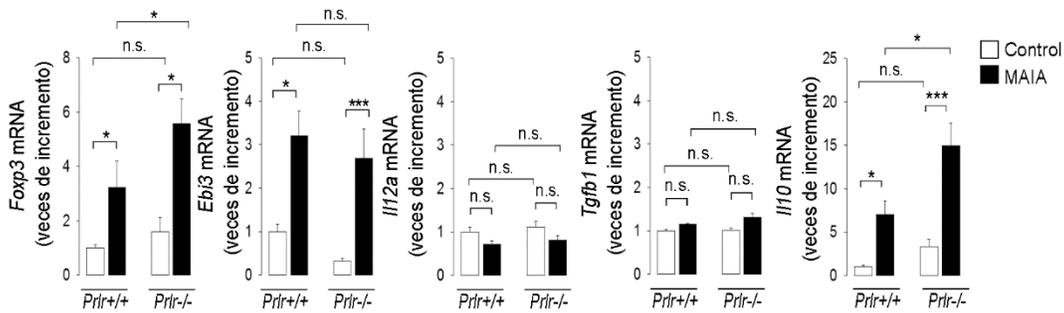


Figura 19. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión de citocinas producidas por células T reguladoras en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). (A) Se muestran los niveles de expresión del mRNA de los factores de transcripción (*Foxp3*) y (B) citocinas (*Ebi3*, *Il12a*, *Tgfb1* e *Il10*) relacionados a la diferenciación y función de células T reguladoras, respectivamente y evaluados en la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Los resultados se presentan como la media ± EE de 8-12 animales. *p <0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no-significativo.

VII.4 La falta del receptor de PRL aumenta la pérdida de hueso cortical y la densidad de osteoclastos en la artritis inducida por antígeno (MAIA)

Se evaluó el efecto de la falta de señalización de PRL sobre la pérdida de hueso trabecular y la densidad de osteoclastos. Los animales *Prlr*^{-/-} controles presentaron un mayor incremento de pérdida ósea trabecular al compararse con animales silvestres (*Prlr*^{+/+}) (Figura 20B). Estos resultados confirman la osteopenia del ratón *Prlr*^{-/-} (Clement-Lacroix et al., 1999). Los animales *Prlr*^{-/-} artríticos presentaron una reducción en el área de hueso trabecular (Figura 20A), así como incremento en la densidad de osteoclastos (Figura 21) y en la expresión génica de *Trap* y *Tnfrsf11* (*RANKL*) respecto a su contraparte silvestre los animales artríticos *Prlr*^{+/+} (Figura 22 y Figura 23). No se observaron diferencias significativas en la expresión génica de *Mmp9*, *Ctsk*, *Tnfrsf11a* (*RANK*), y *Tnfrsf11b* (*OPG*) en los animales *Prlr*^{-/-} en comparación con los animales *Prlr*^{+/+}. No obstante, la expresión génica del ratio *RANKL*/*OPG* fue mayor en los animales *Prlr*^{-/-} (Figura 23).

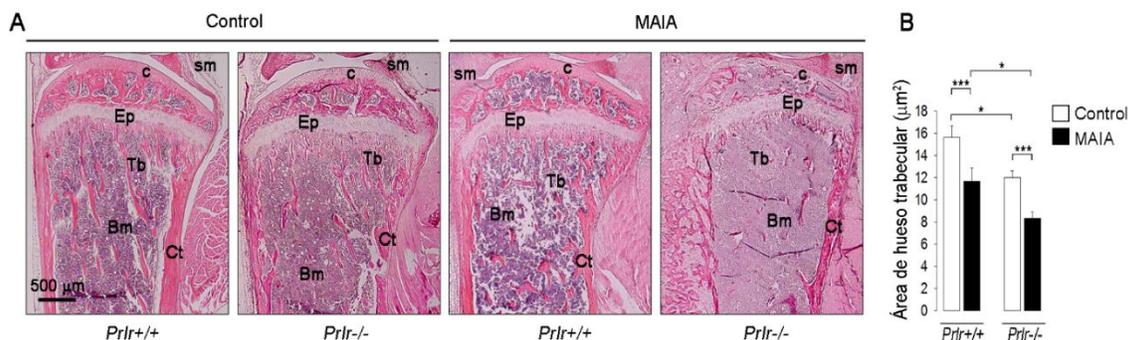


Figura 20. La falta del receptor de PRL reduce el área de hueso trabecular en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de secciones de la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). **Ep**, placa epifiseal; **Bm**, médula ósea; **Ct**, hueso cortical; **Tb**, hueso trabecular; **c**, cartílago; **sm**, membrana sinovial. (B) Se muestran los valores de la cuantificación del área de hueso trabecular/área total de hueso. Los resultados se presentan como la media ± EE de 5-8 animales. *p < 0.05.

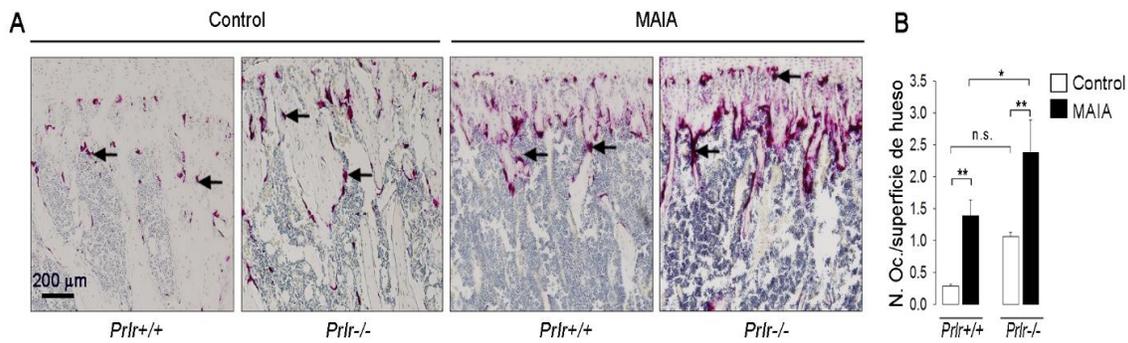


Figura 21. La falta del receptor de PRL aumenta la osteoclastogénesis en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). (A) Imágenes representativas de la evaluación histológica de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) en secciones de la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 después de la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Las células TRAP (+) son indicadas con flechas. **Ep**, placa epifiseal; **Bm**, médula ósea; **Ct**, hueso cortical; **Tb**, hueso trabecular; **c**, cartílago; **sm**, membrana sinovial. (B) Se muestran los valores de la cuantificación del número de osteoclastos/superficie de hueso. Los resultados se presentan como la media ± EE de 5-8 animales. *p <0.05, n.s. no-significativo. Los animales controles *Prlr*^{-/-} presentaron niveles similares en la expresión de los factores osteoclastogénicos (Figura 22).

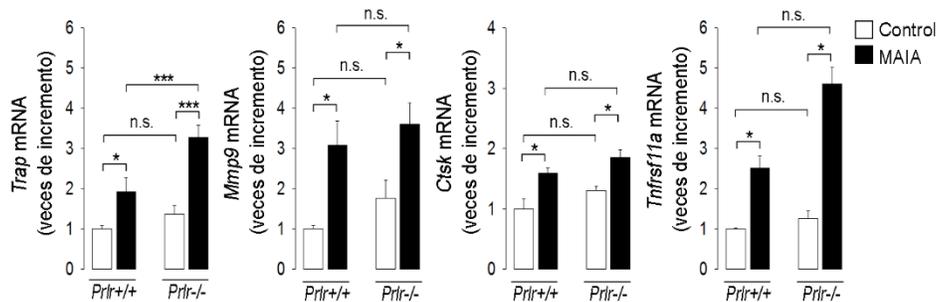


Figura 22. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión del mRNA de mediadores de erosión ósea en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). El nivel de expresión génica de *Trap*, *Mmp9*, *Ctsk*, y *Tnfrsf11a* determinó en la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 posterior a la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Los resultados se presentan como la media ± EE de 5-8 animales. *p <0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no-significativo.

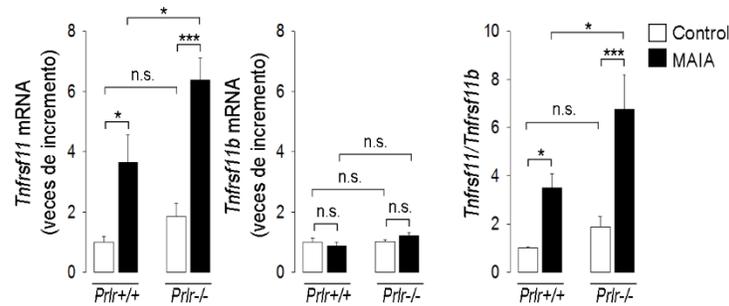


Figura 23. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión del mRNA de marcadores de osteoclastos en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). El nivel de expresión génica de *Tnfrsf11*, *Tnfrsf11b* y su respectivo cociente se determinó en la articulación tibio-femoral de ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) y silvestres (*Prlr*^{+/+}) en el día 18 posterior a la inyección intra-articular del ACF (MAIA) o vehículo (Control). Los resultados se presentan como la media ± EE de 5-8 animales. *p <0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no-significativo.

VII.5 La inyección intra-articular de una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β , IFN γ) induce la expresión del receptor de PRL en la membrana sinovial y en cultivos primarios de fibroblastos sinoviales

Para investigar la participación de la señalización de PRL en la articulación artrítica, un grupo de ratones recibió una inyección intra-articular de una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β , IFN γ) o vehículo (Control) con la finalidad de asemejar la condición inflamatoria ocasionada por artritis. La inyección intra-articular de Cyt elevó la expresión del mRNA de la isoforma larga del receptor de PRL en membranas sinoviales, evaluada 48 h posteriores a la administración de Cyt (**Figura 24**). De la misma forma, cultivos primarios de fibroblastos sinoviales de ratón tratados con la misma combinación de Cyt presentaron un incremento en la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL, analizado a las 24 h posteriores al tratamiento (**Figura 25**). Estos resultados apoyan las acciones directas de la PRL sobre los tejidos de la articulación bajo condiciones de inflamación y sugieren la posible implicación de los fibroblastos sinoviales como blancos celulares de estos efectos.

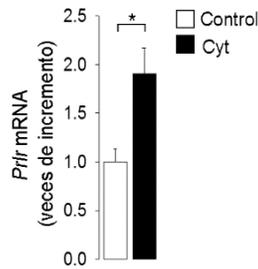


Figura 24. Las citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$) inducen la expresión génica de la isoforma larga del receptor de PRL (PRLR) en la membrana sinovial. El nivel de expresión del mRNA de la isoforma larga del receptor de PRL se determinó en la membrana sinovial de la articulación tibiofemoral de ratones 48 h posteriores a la inyección intra-articular de una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$). Los valores se presentan como la media de \pm EE de 6 articulaciones independientes.

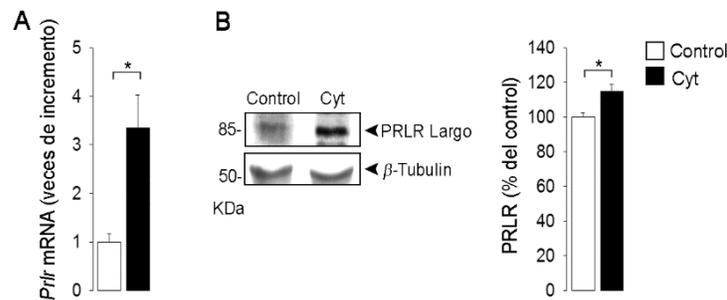


Figura 25. Las citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$) inducen la expresión génica de la isoforma larga del receptor de PRL (PRLR) en fibroblastos sinoviales. (A) Se muestra la cuantificación mediante qRT-PCR de la expresión del mRNA de la isoforma larga del receptor de PRL en fibroblastos sinoviales 24 h después del tratamiento con una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$). Los resultados se presentan como la media \pm EE de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, n.s. no-significativo. (B) Determinación por Western blot de la isoforma larga del receptor de PRL (PRLR Largo) en lisados proteicos de fibroblastos sinoviales 24 h después del tratamiento con una combinación de citocinas pro-inflamatorias. La gráfica muestra los valores de densitometría del cociente PRLR Largo/ β -Tubulina y se presentan como la media \pm EE de 3 blots independientes. * $p < 0.05$.

VII.6 La PRL bloquea la expresión RANKL inducida por citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β , IFN γ) en fibroblastos sinoviales a través de la activación de la vía de STAT3

Para evaluar la acción directa de la PRL en fibroblastos sinoviales, se determinaron los posibles efectos anti-osteoclastogénicos de PRL en cultivos primarios de fibroblastos sinoviales tratados con Cyt. La Cyt estimularon la expresión génica de las citocinas inductoras de osteoclastogénesis: *Il1b*, *Il6* y *Tnfrsf11*. Y este efecto se bloqueó por el tratamiento con PRL (Figura 26). No se observaron cambios significativos en la expresión génica de *Tnfa* o *Tnfrsf11b* (Figura 26). Se ha descrito que la PRL promueve la supervivencia de condrocitos articulares a través de la señalización mediada por STAT3 (Adan et al., 2013), y STAT3 puede inhibir la osteoclastogénesis (Li, 2013). Por lo que determinamos si la PRL señala a través de STAT3 en fibroblastos sinoviales. Los resultados muestran que la PRL estimula la expresión del mRNA de *Stat3* en fibroblastos sinoviales en cultivo (Figura 27A) y promueve la fosforilación/activación de STAT3 cuando las células son cultivadas en presencia de Cyt (Figura 27B). Aunado a esto, la incubación de fibroblastos sinoviales con un inhibidor de STAT3 (S31-201), bloqueó el efecto inhibitorio de PRL sobre la expresión génica de *Tnfrsf11* inducida por Cyt (Figura 27C).

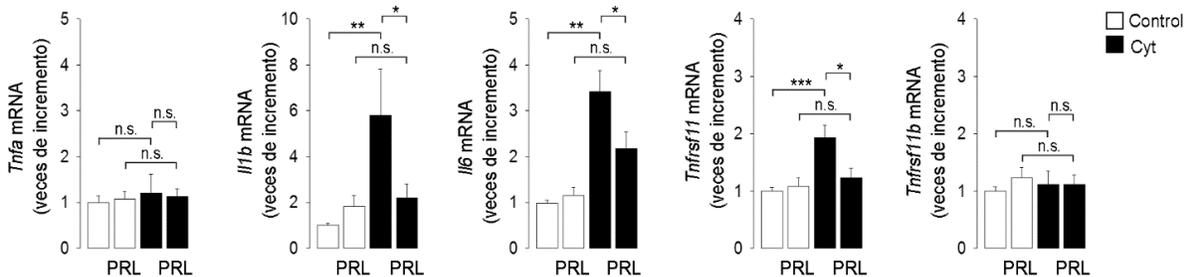


Figura 26. La PRL reduce la expresión de factores osteoclastogénicos inducida por una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β e IFN γ) en fibroblastos sinoviales. Se presenta la evaluación de la expresión del mRNA de *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfrsf11* y *Tnfrsf11b* en fibroblastos sinoviales 24 h después del tratamiento con una combinación de citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β e IFN γ). Los resultados se presentan como la media \pm EE de 3 experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. no-significativo.

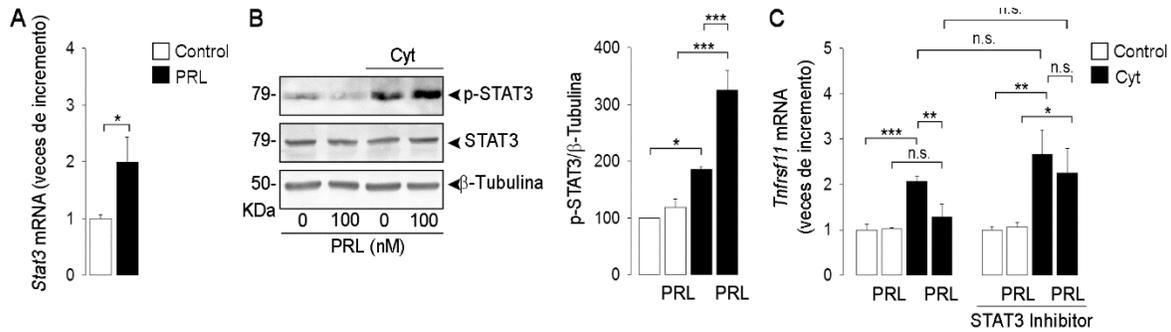


Figura 27. La PRL bloquea la expresión de *Tnfrsf11* en fibroblastos sinoviales a través de la activación de la vía de STAT3. (A) Cuantificación de la expresión génica de *Stat3* en fibroblastos sinoviales incubados (PRL) o no (Control) con 100 nM de PRL durante 24 h. (B) Evaluación por Western blot de la proteína STAT3 fosforilada en extractos de fibroblastos sinoviales incubados durante 30 min con o sin Cyt: (0.25 ng/ml TNF α , 0.05 ng/ml IL-1 β , 0.025 ng/ml IFN γ) presencia o ausencia de 100 nM de PRL. La gráfica muestra los valores de densitometría del cociente p-STAT3// β -Tubulina y se presentan como la media \pm EE de 3 blots independientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (C). Expresión del mRNA de *Tnfrsf11* en fibroblastos sinoviales incubados durante 24h con o sin Cyt, con o sin 100 nM de PRL, en presencia o ausencia de 50 μ M de S31-201 (inhibidor de STAT3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. no-significativo.

VII.7 La PRL reduce la osteoclastogénesis en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos.

Para confirmar que las acciones de la PRL sobre los fibroblastos sinoviales se traducen en una menor osteoclastogénesis, evaluamos los efectos de la PRL en cocultivos de fibroblastos sinoviales y células precursoras de osteoclastos. Para ellos, se co-cultivaron fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos (derivadas de la médula ósea) en presencia de Cyt para promover la secreción de RANKL, factor esencial para la diferenciación de osteoclastos (Tunyogi-Csapo et al., 2008). Los co-cultivos se incubaron durante 10 días, y se reemplazó el medio cada 2 días (conteniendo +/-Cyt, +/- PRL y 1,25-dihidroxi-vitamina-D3) (Figura 28A). El tratamiento con Cyt estimuló la diferenciación de los precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros, evaluado por

la presencia de grandes células multinucleadas TRAP⁺. Este efecto se redujo significativamente por el tratamiento con PRL (**Figura 28B**).

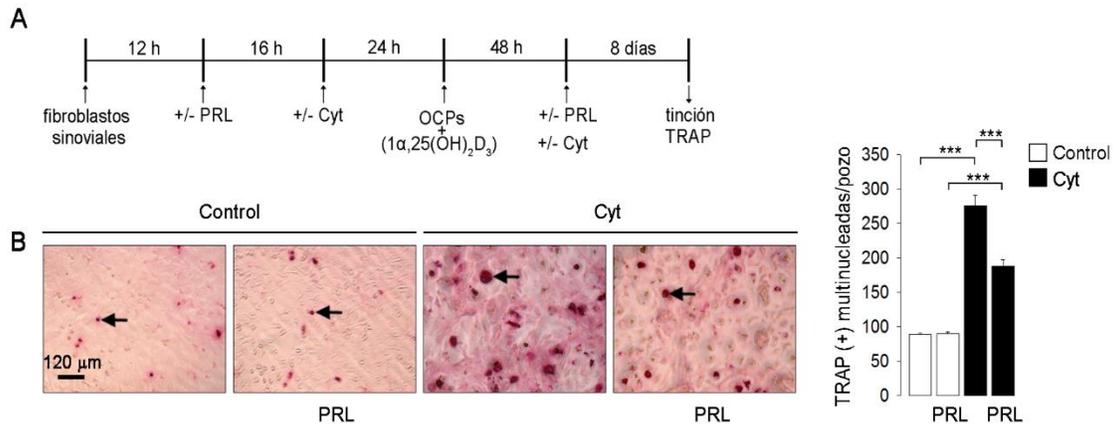


Figura 28. La PRL reduce la osteoclastogénesis inducida por citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β e IFN γ) en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos. (A) Curso temporal del co-cultivo de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos: 12h después de sembrar los fibroblastos sinoviales, las células se incubaron con o sin 100 nM de PRL durante 16 h; posteriormente se incubaron o no con Cyt (0.25 ng/ml TNF α , 0.05 ng/ml IL-1 β , 0.025 ng/ml IFN γ) y transcurridas 24 h se agregaron las células precursoras de osteoclastos en medio conteniendo 1,25-dihidroxi-vitamina-D₃. El co-cultivo se incubó durante 10 días, reemplazando cada 2 días por medio nuevo (conteniendo +/- Cyt, +/- PRL, y 1,25-dihidroxi-vitamina-D₃). (B) La osteoclastogénesis se evaluó determinando el número de células multinucleadas TRAP-positivas (indicado por flechas). La gráfica muestra los valores de la media \pm EE del número de células multinucleadas (≥ 3 núcleos) TRAP-positivas por pozo, (n=5). ***p<0.001.

Para evaluar si el efecto anti-osteoclastogénico de la PRL puede involucrar también acciones directas sobre las células precursoras de osteoclastos, se co-cultivaron fibroblastos sinoviales con células progenitoras de osteoclastos de animales *Prlr*^{-/-} en presencia de Cyt tratados con PRL. El tratamiento con Cyt estimuló la diferenciación de los precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros, en ambos co-cultivos (*Prlr*^{-/-} y *Prlr*^{+/+}) (**Figura 29**), pero no se observaron cambios

significativos en el número de células TRAP⁺ por el tratamiento con PRL cuando los precursores de osteoclastos no contienen a su receptor. Los resultados mostrados sugieren un efecto directo de PRL sobre tanto sobre fibroblastos sinoviales como sobre los progenitores de osteoclastos que resulta en una menor osteoclastogénesis.

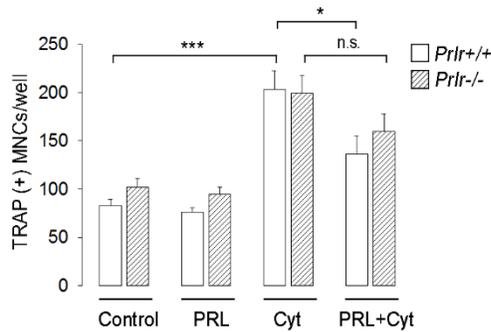


Figura 29. Osteoclastogénesis inducida por citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β e IFN γ) en co-cultivos de fibroblastos sinoviales silvestres y células progenitoras de osteoclastos provenientes de ratones silvestres (*Prlr*^{+/+}) o ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}). Se muestra la osteoclastogénesis evaluada a través del número de células multinucleadas TRAP-positivas en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos. 12h después de sembrar los fibroblastos sinoviales, las células se incubaron con o sin 100 nM de PRL durante 16 h; posteriormente se incubaron o no con Cyt (0.25 ng/ml TNF α , 0.05 ng/ml IL-1 β , 0.025 ng/ml IFN γ) y transcurridas 24 h se agregaron las células precursoras de osteoclastos de ratones silvestres (*Prlr*^{+/+}) o ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) en medio conteniendo 1,25-dihidroxi-vitamina-D3. . El co-cultivo se incubó durante 10 días, reemplazando cada 2 días por medio nuevo (conteniendo +/- Cyt, +/- PRL, y 1,25-dihidroxi-vitamina-D3). La gráfica muestra los valores de la media \pm EE del número de células multinucleadas (≥ 3 núcleos) TRAP-positivas por pozo, (n=5). ***p<0.001.

VII.8 Los condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos sinoviales expresan el mRNA del receptor de la PRL

Adicionalmente a los resultados presentados sobre la expresión del mensajero de la isoforma larga del receptor de PRL en fibroblastos sinoviales, se encontró la presencia de dicho transcrito en otros

tipos celulares de la articulación. La evaluación se realizó en muestras provenientes de ratones silvestres (*Prlr*^{+/+}) y para confirmar la especificidad de la reacción se utilizaron ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}). Se observa la presencia de un transcrito de 139 pb (correspondiente al exón 5 de *Prlr*) en condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos sinoviales provenientes de animales *Prlr*^{+/+}, observándose ausencia de amplificación en los carriles de células proveniente de animales *Prlr*^{-/-} (Figura 30).

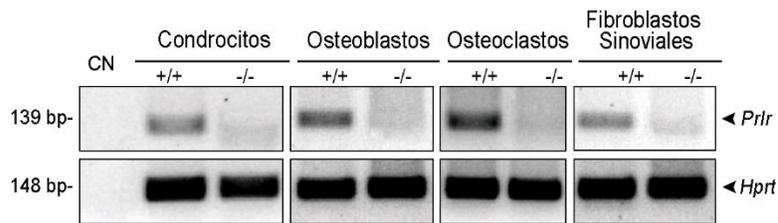


Figura 30. Expresión del RNA mensajero del receptor de la PRL en condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos sinoviales. Se muestra el producto de la amplificación del mRNA para la isoforma larga del receptor de PRL analizado por RT-PCR. La amplificación de *Hprt* corresponde al control interno. CN, control negativo de RNA.

VIII. DISCUSIÓN

La erosión ósea es una característica central en la AR, asociada a la severidad del padecimiento y es el resultado del desbalance entre la resorción del hueso y la formación/reparación de dicho tejido. El proceso de resorción ósea depende del desarrollo de los osteoclastos (osteoclastogénesis) que resorben el hueso en respuesta a señales sistémicas y locales que convergen en el sistema RANKL / RANK / OPG (Braun y Zwerina, 2011; Schett y Gravallesse, 2012). En este trabajo se demostró que la PRL reduce los niveles sistémicos y la producción de citocinas con actividad osteoclastogénica, la expresión de RANKL y RANK, la densidad de osteoclastos y la pérdida ósea trabecular en dos modelos murinos de artritis inflamatoria. Por otra parte, se sabe que los fibroblastos sinoviales son una fuente importante de RANKL (en el sinovio reumático) y contribuyen a la pérdida ósea en la artritis (Tunyogi-Csapo et al., 2008) y aquí se mostró que la PRL bloquea la expresión del RANKL en fibroblastos sinoviales en cultivo a través de la fosforilación/activación de la vía STAT3. Finalmente, esta hormona reduce la osteoclastogénesis a través de acciones directas tanto sobre fibroblastos sinoviales como sobre células progenitoras de osteoclastos.

La inflamación articular crónica interfiere con la homeostasis del hueso e induce su degradación a nivel sistémico y local (Braun y Zwerina, 2011; Schett y Gravallesse, 2012) y estos procesos son atenuados por la PRL. El tratamiento con PRL iniciado tres días antes de la inducción de artritis redujo la inflamación articular, la expresión local de citocinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{IFN-}\gamma$), la formación de pannus y la pérdida ósea trabecular en ratas con AIA. Asimismo, extendimos estos hallazgos mostrando que el incremento en los niveles séricos de PRL similares a los (40 ng/ml) encontrados en la circulación de algunos pacientes con AR (Ghule et al., 2009) reduce la inflamación sistémica evaluada a través de la determinación sérica de $\text{TNF}\alpha$ y PCR, dos citocinas osteoclastogénicas (Braun y Zwerina, 2011; Kim et al., 2015). En pacientes con AR los niveles de $\text{TNF}\alpha$ y PCR en el líquido sinovial se asocian directamente con la inflamación sistémica y articular y

se les considera biomarcadores para el diagnóstico y evaluación de la actividad de la enfermedad (Hamed et al., 2007; Kim et al., 2015).

Por otra parte, el tratamiento con PRL redujo la expresión de factores de transcripción y citocinas asociadas con células colaboradoras TH17 y células T reguladoras en articulaciones artríticas. Las células Th17 promueven la inflamación, la osteoclastogénesis y la erosión ósea en la artritis (Sato et al., 2006; Lubberts, 2010), mientras que las células T reguladoras suprimen la respuesta inmune (Sakaguchi et al., 2010). El desequilibrio entre ambas poblaciones de linfocitos T es un evento clave en la patogénesis de la AR (Alunno et al., 2015). Resta por determinar el significado de las acciones de la PRL sobre la regulación negativa que realizan las células T reguladoras que contribuiría al efecto protector de la PRL contra la inflamación y la osteoclastogénesis en la artritis. El efecto de ambas poblaciones de células T es complejo, dado que la relación entre su diferenciación y función es estrecha, y se modifica por la condición de inflamación (Deknuydt et al., 2009; Diller et al., 2016). Ambas poblaciones de células T requieren de TGF β para su diferenciación (Zhou et al., 2008) y estudios *in vivo* han identificado un subconjunto de células T que expresan dualmente el fenotipo de célula colaboradora Th17 y célula T reguladora (Voo et al., 2009; Diller et al., 2016) y que poseen efectos pro-inflamatorios y osteoclastogénicos en la artritis autoinmune (Komatsu et al., 2014).

En apoyo a que la PRL actúa directamente sobre los tejidos articulares inflamados, demostramos que la isoforma larga del PRLR se regula positivamente en las articulaciones de ratas con AIA, en las membranas sinoviales y en fibroblastos sinoviales de ratones tratados con una combinación de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL- β e IFN γ) que se sabe contribuyen a las lesiones inflamatorias en AIA (Panayi et al., 1992). Los receptores de PRL existen en diversas formas moleculares que difieren principalmente en la secuencia y la longitud de su dominio citoplásmico. Estos receptores se clasifican como corto, intermedio y largo (Bole-Feysot et al., 1998). Se considera que la isoforma

larga del PRLR señala todas las acciones de la hormona, la isoforma intermedia media efectos de proliferación celular y señales de supervivencia, mientras que la isoforma corta ejerce efectos negativos dominantes sobre el receptor largo (Ben-Jonathan et al., 1996). La isoforma larga del receptor parece predominar en osteoblastos (Clement-Lacroix et al., 1999) y condrocitos (Zermeño et al., 2006), en donde la PRL promueve el desarrollo óseo y la supervivencia del cartílago. Además, los fibroblastos y las células T en el sinovio de pacientes con AR también expresan receptores de PRL (Nagafuchi et al., 1999), y las citocinas pueden inducir la expresión de la isoforma larga del receptor en fibroblastos pulmonares para mediar efectos anti-inflamatorios de la PRL en las vías respiratorias (Corbacho et al., 2003). Todos estos hallazgos indican que la isoforma larga del receptor media las acciones protectoras de la PRL en la artritis.

En apoyo al papel anti-inflamatorio de la PRL en la artritis, los ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) presentaron mayor inflamación articular (hinchazón y edema) y un incremento en la expresión génica de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17A, IL21, IL-22, IL-23 e IL-10) en el modelo de artritis mono-articular (MAIA). Estos hallazgos son consistentes con la inhibición que ejerce la PRL sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en ratas con AIA (Adan et al., 2013) y con reportes previos que muestran que la delección génica de PRL (Dugan et al., 2002) y de sus receptores PRL (Moreno-Carranza et al., 2013) incrementa la respuesta inmune y la mortalidad bajo condiciones de inflamación relacionadas con estrés. Adicionalmente a los efectos de las citocinas TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-17A sobre la inflamación articular, destacan sus efectos promotores de la pérdida ósea. Estas citocinas promueven la resorción ósea osteoclástica mediante la estimulación de la expresión y funciones de RANKL y RANK (Sato et al., 2006; Braun y Zwerina, 2011). Por lo que, en este trabajo investigamos si la PRL regula negativamente la pérdida ósea y el desarrollo de osteoclastos en la AIA y MAIA.

La elevación en los niveles sistémicos de PRL en ratas con AIA y el bloqueo de la señalización del receptor de PRL en ratones *Prlr*^{-/-} con MAIA disminuyó y aumentó, respectivamente, la pérdida ósea trabecular, la densidad de osteoclastos y la acumulación de marcadores de osteoclastos (RANKL y RANK) y de genes que codifican para moléculas involucradas en la degradación de la matriz orgánica del hueso (TRAP, catepsina K y MMP-9) (Schett y Gravallese, 2012). Por otra parte, la PRL y la falta de señalización de la hormona redujeron y aumentaron, respectivamente, la expresión del gen RANKL (*Tnfrsf11*) en la articulación artrítica, dando lugar a la reducción (en la AIA) y al incremento (en la MAIA) en la proporción de *Tnfrsf11* / *Tnfrsf11b*. *Tnfrsf11b* codifica para OPG, un receptor de señuelo soluble que neutraliza RANKL y previene la erosión ósea en la AIA (Kong et al., 1999). El cociente elevado RANKL / OPG ocurre en pacientes con AR y se asocia con una mayor resorción ósea (Fadda et al., 2015).

Nuestros hallazgos indican que la inhibición de la expresión y consecuente actividad de RANKL sobre la osteoclastogénesis media el valor protector de la PRL contra la pérdida de masa ósea en la artritis inflamatoria. No obstante, no es claro si la PRL señala directamente sobre osteoclastos o indirectamente en otros tipos celulares que también contribuyen a la resorción ósea. En contra de la acción directa de la PRL sobre osteoclastos se ha reportado que esta estirpe celular carece del receptor de PRL. Por lo que, la PRL estaría actuando únicamente sobre condrocitos, osteoblastos y fibroblastos sinoviales que expresan receptores PRL y son fuentes principales de citocinas osteoclastogénicas incluyendo RANKL (Tunyogi-Csapo et al., 2008; Braun y Zwerina, 2011; Martinez-Calatrava et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados señalan que la PRL también podría actuar sobre osteoclastos. La amplificación por PCR del transcrito del PRLR muestra su expresión en los diversos tipos celulares antes mencionados, pero también en osteoclastos diferenciados. La especificidad de dicha detección se fundamenta en la ausencia de dicho transcrito cuando los tipos celulares se obtienen de ratones *Prlr*^{-/-}. Diferencias en los protocolos de

diferenciación pudieran contribuir a explicar el contraste de nuestros resultados con los hallazgos negativos sobre la presencia del receptor de PRL en osteoclastos diferenciados *in vitro* (Clement-Lacroix et al., 1999). No obstante, el haber encontrado al receptor de PRL en osteoclastos refuerza su conocida participación en la remodelación ósea (Clapp et al., 2016).

Las acciones directas de la PRL sobre osteoclastogénesis refuerzan aún más sus blancos celulares. La expresión del receptor de la PRL se incrementa en cultivos de fibroblastos sinoviales tratados con citocinas pro-inflamatorias (Cyt: TNF α , IL-1 β e IFN γ), y en estas células la PRL ejerce acciones anti-osteoclastogénicas a través de inhibir la expresión de *Il1b*, *Il6* y *Tnfrsf11* inducida por Cyt. La señalización clásica del receptor de PRL ocurre a través de la vía JAK2/STATs 1, 5 y 3 (DaSilva et al., 1996). Recientemente se ha descrito que STAT3 es determinante para la homeostasis ósea (Aarden et al., 1994). En la clínica, las mutaciones en STAT3 correlacionan con el aumento del número de osteoclastos y la resorción ósea (Holland et al., 2007; Minegishi et al., 2007) y la delección específica de STAT3 en osteoblastos genera un fenotipo osteopénico (Aarden et al., 1994).

En este estudio demostramos que la PRL estimula la expresión génica y la fosforilación / activación de STAT3 en fibroblastos sinoviales tratados con Cyt. El efecto de las Cyt sobre STAT3 se puede adscribir a la IL-6. La IL-6 estimula la activación de STAT3 (Hashizume et al., 2008) que conduce a la resorción ósea (O'Brien et al., 1999), pero también a la formación de hueso (Shin et al., 2004). En apoyo, al efecto anti-osteoclastogénico de STAT3 activado por PRL, el bloqueo farmacológico de STAT3 previno la inhibición por PRL de la expresión génica de RANKL (*Tnfrsf11*) inducida por Cyt. Estos hallazgos sugieren que la PRL puede señalizar a través de STAT3 en fibroblastos sinoviales para inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL. De forma consistente, encontramos que la PRL actúa sobre co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células precursoras de osteoclastos reduciendo la osteoclastogénesis inducida por Cyt. El hecho de que el efecto inhibitorio de PRL se

reduce cuando las células precursoras de osteoclastos provienen de ratones *Prlr*^{-/-}, implica que estas células son blanco directo de la PRL y contribuyen a sus efectos protectores en contra de la osteoclastogénesis. Esta propuesta es consistente con nuestros resultados que muestran la presencia de los receptores de PRL en osteoclastos diferenciados y con la regulación a la baja de RANK en las articulaciones artríticas. RANK solamente se expresa en osteoclastos (Atkins et al., 2006) y la reducción en sus niveles por efecto de la PRL podría explicar la contribución de los progenitores de osteoclastos y/o de osteoclastos maduros a las acciones anti-osteoclastogénicas de la hormona. Esta bien documentado que la PRL regula al sistema RANKL / RANK / OPG para la remodelación ósea fisiológica durante el crecimiento y la reproducción (Clapp et al., 2016). La PRL disminuye la relación RANKL / OPG en osteoblastos para promover la formación ósea durante el desarrollo (Seriwatanachai et al., 2008). Mientras que la PRL acelera el recambio óseo incrementando el cociente RANKL / OPG en osteoblastos para suplir la demanda de calcio necesaria en el crecimiento fetal y la producción de leche durante el embarazo y la lactancia, respectivamente (Lotinun et al., 2003; Seriwatanachai et al., 2008). Estos efectos opuestos de PRL sobre el remodelamiento óseo indican que la resultante del efecto hormona depende de interacciones complejas relacionadas con la edad y el estado fisiológico.

En la artritis inflamatoria experimental, la PRL parece ser beneficiosa. Sin embargo, el papel de la PRL en la AR es aun controversial (Clapp et al., 2016). La PRL aumenta en la circulación de algunos pacientes con AR, si bien los niveles de PRL no se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Las discrepancias entre los niveles sistémicos de la PRL y la severidad de la AR podrían aclararse si se considera que la PRL puede incrementarse localmente en la articulación. La PRL se sintetiza localmente por células de la articulación que incluyen a los condrocitos (Macotella et al., 2006), las células endoteliales (Corbacho et al., 2000), los sinoviocitos y las células inmunes (Nagafuchi et al., 1999). Además, se conoce que la PRL puede ejercer efectos inmunoestimuladores o

inmunosupresores que dependen de su concentración y también de las condiciones fisiopatológicas (Clapp et al., 2016). Por ejemplo, altos niveles circulantes de PRL bajo condiciones de estrés e inflamación pueden ejercer acciones anti-inflamatorias (Jacobi et al., 2001; Adan et al., 2013); mientras que la hiperprolactinemia fisiológica en el contexto de la reproducción (Lotinun et al., 2003) y la patología no inflamatoria (prolactinoma) (Mazziotti et al., 2011) promueve la pérdida ósea. Los mecanismos que gobiernan los efectos de la PRL en la inflamación y en la remodelación ósea son complejos, pero es claro que su mejor comprensión puede conducir al uso de fármacos inductores de hiperprolactinemia como agentes terapéuticos en la clínica.

IX. CONCLUSIÓN

La PRL protege contra la pérdida ósea y la osteoclastogénesis en la artritis inflamatoria experimental a través de la inhibición de la expresión/activación de RANKL inducida por citocinas pro-inflamatorias en la articulación y en fibroblastos sinoviales vía la activación de la cascada de señalización de STAT3. Estos hallazgos sugieren el potencial terapéutico de fármacos inductores de hiperprolactinemia en la AR.

X. REFERENCIAS

- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. **Function of osteocytes in bone.** *J Cell Biochem* 55: 287-99, 1994.
- Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG, Perales-Canales SI, Quintanar-Stephano A, Lopez-Barrera F, Mendez I, Moreno-Carranza B, Triebel J, Binart N, Martinez de la Escalera G, Thebault S, Clapp C. **Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis.** *J Clin Invest* 123: 3902-13, 2013.
- Alamanos Y, Drosos AA. **Epidemiology of adult rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 4: 130-6, 2005.
- Alunno A, Manetti M, Caterbi S, Ibbamanneschi L, Bistoni O, Bartoloni E, Valentini V, Terenzi R, Gerli R. **Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications.** *Mediators Inflamm* 2015: 751793, 2015.
- Alves CH, Farrell E, Vis M, Colin EM, Lubberts E. **Animal Models of Bone Loss in Inflammatory Arthritis: from Cytokines in the Bench to Novel Treatments for Bone Loss in the Bedside-a Comprehensive Review.** *Clin Rev Allergy Immunol* 51: 27-47, 2016.
- Amarasekara DS, Yu J, Rho J. **Bone Loss Triggered by the Cytokine Network in Inflammatory Autoimmune Diseases.** *J Immunol Res* 2015: 832127, 2015.
- Arend WP. **Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 45: 101-6, 2001.
- Armaka M, Gkretsi V, Kontoyiannis D, Kollias G. **A standardized protocol for the isolation and culture of normal and arthritogenic murine synovial fibroblasts.** *Protocolo Exchange*: doi:10.1038/nprot.2009.102, 2009.
- Atkins GJ, Kostakis P, Vincent C, Farrugia AN, Houchins JP, Findlay DM, Evdokiou A, Zannettino AC. **RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone.** *J Bone Miner Res* 21: 1339-49, 2006.
- Axmann R, Bohm C, Kronke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. **Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo.** *Arthritis Rheum* 60: 2747-56, 2009.
- Barland P, Novikoff AB, Hamerman D. **Electron microscopy of the human synovial membrane.** *J Cell Biol* 14: 207-20, 1962.
- Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman A. **Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum* 43: 1010-5, 2000.
- Bataille-Simoneau N, Gerland K, Chappard D, Basle MF, Mercier L. **Expression of prolactin receptors in human osteosarcoma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 229: 323-8, 1996.
- Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. **Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation.** *Surgery (Oxford)* 30: 47-53, 2012.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. **Focus on prolactin as a metabolic hormone.** *Trends Endocrinol Metab* 17: 110-6, 2006.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. **What can we learn from rodents about prolactin in humans?** *Endocr Rev* 29: 1-41, 2008.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. **Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects.** *Endocr Rev* 17: 639-69, 1996.
- Bendele A. **Animal models of rheumatoid arthritis.** *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1: 377-85, 2001.
- Berczi I, Nagy E. **A possible role of prolactin in adjuvant arthritis.** *Arthritis Rheum* 25: 591-4, 1982.
- Berczi I, Nagy E, Kovacs K, Horvath E. **Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 98: 506-13, 1981.
- Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. **New concepts in prolactin biology.** *J Endocrinol* 206: 1-11, 2010.
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. **Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis?** *Arthritis Rheum* 62: 2192-205, 2010.

- Binder NB, Puchner A, Niederreiter B, Hayer S, Leiss H, Bluml S, Kreindl R, Smolen JS, Redlich K. **Tumor necrosis factor-inhibiting therapy preferentially targets bone destruction but not synovial inflammation in a tumor necrosis factor-driven model of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 65: 608-17, 2013.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. **Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide.** *Am J Pathol* 146: 75-85, 1995.
- Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R, Serlupi-Crescenzi O. **Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis.** *Cytokine* 11: 1057-64, 1999.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. **Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.** *Endocr Rev* 19: 225-68, 1998.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. **Osteoclast differentiation and activation.** *Nature* 423: 337-42, 2003.
- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J. **Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells.** *Eur Cytokine Netw* 15: 99-104, 2004.
- Braun T, Zwerina J. **Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 13: 235, 2011.
- Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC. **Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption.** *Endocrinology* 134: 169-76, 1994.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. **osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.** *Genes Dev* 12: 1260-8, 1998.
- Burr DB, Bellido T, White KE. 2011. **Bone structure and function.** En MC Hochberg (Eds.), *Rheumatology*. (p. 1027). Philadelphia, PA: Elsevier
- Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. **Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein.** *Arthritis Rheum* 46: 802-5, 2002.
- Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. **Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist.** *Eur Cytokine Netw* 6: 225-30, 1995.
- Carreno PC, Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG. **Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells.** *J Neuroimmunol* 153: 83-90, 2004.
- Cesano A, Oberholtzer E, Contarini M, Geuna M, Bellone G, Matera L. **Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors.** *Immunopharmacology* 28: 67-75, 1994.
- Clapp C, Adan N, Ledesma-Colunga MG, Solis-Gutierrez M, Triebel J, Martinez de la Escalera G. **The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview.** *Cell Mol Life Sci* 73: 2929-48, 2016.
- Clapp C, Lopez-Gomez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotela Y, Duenas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E, Martinez de la Escalera G. **Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects.** *J Endocrinol* 158: 137-44, 1998.
- Clarke B. **Normal bone anatomy and physiology.** *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-9, 2008.
- 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 PA. **Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice.** *Endocrinology* 140: 96-105, 1999.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts.** *FEBS Lett* 544: 171-5, 2003.

- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, Martinez De La Escalera G, Clapp C. **Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms.** *J Endocrinol* 166: 53-62, 2000.
- Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA, Walker AM. **Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1216-25, 2000.
- Costanza M, Binart N, Steinman L, Pedotti R. **Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology.** *Autoimmun Rev* 14: 223-30, 2015.
- Charoenphandhu N, Krishnamra N. **Prolactin is an important regulator of intestinal calcium transport.** *Can J Physiol Pharmacol* 85: 569-81, 2007.
- Charoenphandhu N, Teerapornpuntakit J, Methawasin M, Wongdee K, Thongchote K, Krishnamra N. **Prolactin decreases expression of Runx2, osteoprotegerin, and RANKL in primary osteoblasts derived from tibiae of adult female rats.** *Can J Physiol Pharmacol* 86: 240-8, 2008.
- Choy EH, Panayi GS. **Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 344: 907-16, 2001.
- Chuang E, Molitch ME. **Prolactin and autoimmune diseases in humans.** *Acta Biomed* 78 Suppl 1: 255-61, 2007.
- DaSilva L, Rui H, Erwin RA, Howard OM, Kirken RA, Malabarba MG, Hackett RH, Larner AC, Farrar WL. **Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580.** *Mol Cell Endocrinol* 117: 131-40, 1996.
- Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M. **IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells.** *Clin Immunol* 131: 298-307, 2009.
- Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. **Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.** *Nat Med* 13: 156-63, 2007.
- Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. **Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells.** *Mediators Inflamm* 2016: 6309219, 2016.
- Dinarelli CA. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 87: 2095-147, 1996.
- Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, Hooghe-Peters EL. **Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes.** *J Neuroimmunol* 120: 58-66, 2001.
- Dominguez-Caceres MA, Garcia-Martinez JM, Calcabrini A, Gonzalez L, Porque PG, Leon J, Martin-Perez J. **Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells.** *Oncogene* 23: 7378-90, 2004.
- Donaldson LF, Seckl JR, McQueen DS. **A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose.** *J Neurosci Methods* 49: 5-10, 1993.
- Dugan AL, Thellin O, Buckley DJ, Buckley AR, Ogle CK, Horseman ND. **Effects of prolactin deficiency on myelopoiesis and splenic T lymphocyte proliferation in thermally injured mice.** *Endocrinology* 143: 4147-51, 2002.
- Erb N, Pace AV, Delamere JP, Kitas GD. **Control of unremitting rheumatoid arthritis by the prolactin antagonist cabergoline.** *Rheumatology (Oxford)* 40: 237-9, 2001.
- Fadda S, Hamdy A, Abulkhair E, Mahmoud Elsify H, Mostafa A. **Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with rheumatoid arthritis and their relation to bone mineral density and disease activity** *The Egyptian Rheumatologist* 37: 1-6, 2015.
- Feng X, McDonald JM. **Disorders of bone remodeling.** *Annu Rev Pathol* 6: 121-45, 2011.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. **Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.** *Biomed Res Int* 2015: 421746, 2015.

- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. **T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.** *J Exp Med* 183: 2593-603, 1996.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. **Prolactin: structure, function, and regulation of secretion.** *Physiol Rev* 80: 1523-631, 2000.
- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA. **Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development.** *J Clin Invest* 99: 1107-17, 1997.
- Freund J. **The mode of action of immunologic adjuvants.** *Bibl Tuberc*: 130-48, 1956.
- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. **TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts.** *J Exp Med* 188: 997-1001, 1998.
- Gauldie SD, McQueen DS, Clarke CJ, Chessell IP. **A robust model of adjuvant-induced chronic unilateral arthritis in two mouse strains.** *J Neurosci Methods* 139: 281-91, 2004.
- Ghule S, Dhotre A, Gupta M, Dharme P, Vaidya SM. **Serum prolactin levels in women with rheumatoid arthritis.** *Biomedical Research* 20: 115-8, 2009.
- Goffin V, Touraine P. **The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: browsing new potential indications.** *Expert Opin Ther Targets* 19: 1229-44, 2015.
- Goldring MB. **Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20: 1003-25, 2006.
- Goldring SR. **Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 42 Suppl 2: ii11-6, 2003.
- Goldring SR, Goldring MB. 2017. **Biology of the normal joint.** En GS Firestein, RC Budd, SE Gabriel, IB McInnes, JR O'Dell (Eds.), Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. (p. 2288: Elsevier
- Goldring SR, Gravalles EM. **Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: diagnosis and therapeutic implications.** *Arthritis Res* 2: 33-7, 2000.
- Grattan DR, Kokay IC. **Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone.** *J Neuroendocrinol* 20: 752-63, 2008.
- Gravalles EM, Monach P, A. 2016. **The rheumatoid joint: synovitis and tissue destruction.** En GS Firestein, RC Budd, SE Gabriel, IB McInnes, JR O'Dell (Eds.), Kelley & Firestein's Textbook of Rheumatology (p. 2086: Elsevier
- Hadjidakis DJ, Androulakis, II. **Bone remodeling.** *Ann N Y Acad Sci* 1092: 385-96, 2006.
- Hamed EA, Hamed EA, Hamed SA, Gamal H-A. **Synovial Fluid and Serum Levels of sE-Selectin, IL-1 β and TNF- α in Rheumatoid Arthritis.** *JKAU: Med. Sci.* 14: 19-34, 2007.
- Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. **IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17.** *Rheumatology (Oxford)* 47: 1635-40, 2008.
- Hashizume M, Mihara M. **The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis* 2011: 765624, 2011.
- Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, Nickerson-Nutter CL. **Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 67: 1505-15, 2008.
- Heinegard D, Lorenzo P, Saxne T. 2011. **The articular cartilage.** En MC Hochberg (Eds.), Rheumatology. (p. 1027). Philadelphia, PA: Elsevier
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schaffer AA, Puck JM, Grimbacher B. **STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome.** *N Engl J Med* 357: 1608-19, 2007.

- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. **Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice.** *J Exp Med* 191: 313-20, 2000.
- Horseman ND, Yu-Lee LY. **Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines.** *Endocr Rev* 15: 627-49, 1994.
- Isomaki P, Punnonen J. **Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis.** *Ann Med* 29: 499-507, 1997.
- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. **Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint.** *Arch Histol Cytol* 63: 17-31, 2000.
- Jacobi AM, Rohde W, Volk HD, Dorner T, Burmester GR, Hiepe F. **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: 242-7, 2001.
- Jara LJ, Lavalle C, Fraga A, Gomez-Sanchez C, Silveira LH, Martinez-Osuna P, Germain BF, Espinoza LR. **Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases.** *Semin Arthritis Rheum* 20: 273-84, 1991.
- Jones DH, Kong YY, Penninger JM. **Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis.** *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii32-9, 2002.
- Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. **Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease.** *Pathophysiology* 12: 167-81, 2005.
- Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. **Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study.** *Arthritis Rheum* 50: 3458-67, 2004.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. **Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.** *EMBO J* 10: 4025-31, 1991.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. **The prolactin/growth hormone receptor family.** *Endocr Rev* 12: 235-51, 1991.
- Kim KW, Kim BM, Moon HW, Lee SH, Kim HR. **Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 17: 41, 2015.
- Kini U, Nandeesh BN. 2012. **Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism.** En I Fogelman, G Gopinath, H van der Wall (Eds.), *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging.* (pp. 29-57). Berlin, : Springer Berlin Heidelberg
- Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. **Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis.** *Nat Med* 20: 62-8, 2014.
- Komori T. **Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development.** *J Bone Miner Metab* 21: 193-7, 2003.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. **Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.** *Nature* 402: 304-9, 1999.
- Krishnamra N, Cheeveewattana V. **Studies of acute effect of prolactin on distribution of absorbed calcium and long-term effect on calcium balance in weaned, young, and sexually mature rats.** *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1521-7, 1994.
- Krishnamra N, Seemoung J. **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: 1157-65, 1996.

- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. **Regulation of bone mass by Wnt signaling.** *J Clin Invest* 116: 1202-9, 2006.
- Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, Ho SM. **Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions.** *Am J Pathol* 154: 863-70, 1999.
- Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, Chung CH, Kwack KB, Lee ZH, Kim HH. **Tumor necrosis factor-alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK.** *J Biol Chem* 276: 49343-9, 2001.
- Li J. **JAK-STAT and bone metabolism.** *JAKSTAT* 2: e23930, 2013.
- Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y. **MicroRNA control of bone formation and homeostasis.** *Nat Rev Endocrinol* 8: 212-27, 2012.
- Lotinun S, Limlomwongse L, Krishnamra N. **The study of a physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats.** *Can J Physiol Pharmacol* 76: 218-28, 1998.
- Lotinun S, Limlomwongse L, Sirikulchayanonta V, Krishnamra N. **Bone calcium turnover, formation, and resorption in bromocriptine- and prolactin-treated lactating rats.** *Endocrine* 20: 163-70, 2003.
- Lubberts E. **Th17 cytokines and arthritis.** *Semin Immunopathol* 32: 43-53, 2010.
- Mackie EJ. **Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture.** *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1301-5, 2003.
- Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin.** *J Cell Sci* 119: 1790-800, 2006.
- Martinez-Calatrava MJ, Prieto-Potin I, Roman-Blas JA, Tardio L, Largo R, Herrero-Beaumont G. **RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis.** *Arthritis Res Ther* 14: R149, 2012.
- Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. **Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes.** *Brain Behav Immun* 6: 409-17, 1992.
- Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti E, Contarini M, Moro F, Basso G. **Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions.** *Immunology* 100: 29-36, 2000.
- Mattsson R, Mattsson A, Hansson I, Holmdahl R, Rook GA, Whyte A. **Increased levels of prolactin during, but not after, the immunisation with rat collagen II enhances the course of arthritis in DBA/1 mice.** *Autoimmunity* 11: 163-70, 1992.
- Mazziotti G, Porcelli T, Mormando M, De Menis E, Bianchi A, Mejia C, Mancini T, De Marinis L, Giustina A. **Vertebral fractures in males with prolactinoma.** *Endocrine* 39: 288-93, 2011.
- McInnes IB, Schett G. **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Immunol* 7: 429-42, 2007.
- Mendez I, Carino C, Diaz L. **[Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects].** *Rev Invest Clin* 57: 447-56, 2005.
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. **Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome.** *Nature* 448: 1058-62, 2007.
- Montgomery DW. **Prolactin production by immune cells.** *Lupus* 10: 665-75, 2001.
- Moreno-Carranza B, Goya-Arce M, Vega C, Adan N, Triebel J, Lopez-Barrera F, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **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* 305: R720-6, 2013.
- Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. **Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 26: 1890-900, 1999.
- Nagy E, Berczi I. **Immunodeficiency in hypophysectomized rats.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 89: 530-7, 1978.
- Neidhart M, Fluckiger EW. **Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis.** *Immunology* 77: 449-55, 1992.
- Neve A, Corrado A, Cantatore FP. **Osteoblast physiology in normal and pathological conditions.** *Cell Tissue Res* 343: 289-302, 2011.
- NIH. 2011. National Institute of Health. Guía para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Washington D. C.: National Academy Press
- Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Toyama Y, Matsumoto H, Fujikawa K, Tada N. **Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice.** *J Immunol* 172: 577-84, 2004.
- O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. **STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone.** *J Biol Chem* 274: 19301-8, 1999.
- O'Gradaigh D, Ireland D, Bord S, Compston JE. **Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts.** *Ann Rheum Dis* 63: 354-9, 2004.
- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Biskup C, Schedlowski M, Nast-Kolb D, Exton MS. **Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice.** *J Surg Res* 113: 248-56, 2003.
- Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K. **Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha.** *Virology* 194: 314-31, 1993.
- Ogston AG, Stanier JE. **The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties.** *J Physiol* 119: 244-52, 1953.
- Ogueta S, Munoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP. **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, 2002.
- Okamoto H, Yamamura M, Morita Y, Harada S, Makino H, Ota Z. **The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 40: 1096-105, 1997.
- Orbach H, Shoenfeld Y. **Hyperprolactinemia and autoimmune diseases.** *Autoimmun Rev* 6: 537-42, 2007.
- Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. **The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 35: 729-35, 1992.
- Parfitt AM. **Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.** *J Cell Biochem* 55: 273-86, 1994.
- Paulsen F, Waschke J. 2013. **General Anatomy.** Sobotta Atlas of Human Anatomy. (p. 416: Elsevier
- Pepys MB, Hirschfield GM. **C-reactive protein: a critical update.** *J Clin Invest* 111: 1805-12, 2003.
- Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. **Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 68: 526-30, 2009.

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 284: 143-7, 1999.
- Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. **The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk.** *J Lipid Res* 48: 751-62, 2007.
- Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. **Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining.** *Arthritis Rheum* 37: 212-20, 1994.
- Ralston SH, McInnes IB. 2014. **Rheumatology and bone disease.** En R Walker, NR Colledge, SH Ralston, I Penman (Eds.), *Davidson's Principles and Practice of Medicine.* (p. 1392: Elsevier
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. **FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system.** *Nat Rev Immunol* 10: 490-500, 2010.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. **Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.** *J Exp Med* 203: 2673-82, 2006.
- Sato T, Kawano H, Kato S. **Study of androgen action in bone by analysis of androgen-receptor deficient mice.** *J Bone Miner Metab* 20: 326-30, 2002.
- Schett G, Gravallese E. **Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment.** *Nat Rev Rheumatol* 8: 656-64, 2012.
- Schopf LR, Anderson K, Jaffee BD. 2006. **Rat models of arthritis: Similarities, differences, advantages, and disadvantages in the identification of novel therapeutics.** En CA Stevenson, LA Marshall, D Morgan (Eds.), *In Vivo Models of Inflammation.* (pp. 1-34). Boston: Birkhäuser
- Seriwatanachai D, Charoenphandhu N, Suthiphongchai T, Krishnamra N. **Prolactin decreases the expression ratio of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin in human fetal osteoblast cells.** *Cell Biol Int* 32: 1126-35, 2008.
- Seriwatanachai D, Thongchote K, Charoenphandhu N, Pandaranandaka J, Tudpor K, Teerapornpuntakit J, Suthiphongchai T, Krishnamra N. **Prolactin directly enhances bone turnover by raising osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio.** *Bone* 42: 535-46, 2008.
- Shelly S, Boaz M, Orbach H. **Prolactin and autoimmunity.** *Autoimmun Rev* 11: A465-70, 2012.
- Shin HI, Divieti P, Sims NA, Kobayashi T, Miao D, Karaplis AC, Baron R, Bringhurst R, Kronenberg HM. **Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro.** *Endocrinology* 145: 1376-85, 2004.
- Smith MD, Walker JG. 2011. **The synovium.** En MC Hochberg (Eds.), *Rheumatology.* (p. 1027). Philadelphia, PA: Elsevier
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. **Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation.** *J Biol Chem* 276: 8836-40, 2001.
- Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, Corbin T, Van G, Bolon B, Sarosi I, McCabe J, Zack DJ, Kostenuik P. **Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses.** *J Immunol* 179: 7497-505, 2007.
- Taichman RS. **Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.** *Blood* 105: 2631-9, 2005.

- Takayanagi H. **Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone.** *Nat Rev Rheumatol* 5: 667-76, 2009.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. **A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum.** *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1058-63, 1980.
- Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. **Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts.** *J Exp Med* 164: 104-12, 1986.
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. **Isolation and characterization of the human prolactin gene.** *EMBO J* 3: 429-37, 1984.
- Tsukasaki M, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Miyazono A, Miyamoto Y, Suzawa T, Takami M, Yoshimura K, Morimura N, Yamamoto M, Kamijo R. **Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF-alpha.** *Biochem Biophys Res Commun* 410: 766-70, 2011.
- Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. **Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption.** *Arthritis Rheum* 58: 2397-408, 2008.
- van de Wijngaert FP, Burger EH. **Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification.** *J Histochem Cytochem* 34: 1317-23, 1986.
- van den Berg WB. **Lessons from animal models of arthritis over the past decade.** *Arthritis Res Ther* 11: 250, 2009.
- Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ. **Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4793-8, 2009.
- Walsh JS. **Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation.** *Surgery (Oxford)* 33: 1-6, 2015.
- Wang J, Zhou J, Cheng CM, Kopchick JJ, Bondy CA. **Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth.** *J Endocrinol* 180: 247-55, 2004.
- Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. **IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis.** *J Clin Invest* 115: 282-90, 2005.
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. **Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone.** *J Clin Invest* 102: 274-82, 1998.
- Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG, Tornell J. **Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland.** *Endocrinology* 138: 4410-5, 1997.
- Whitacre CC. **Sex differences in autoimmune disease.** *Nat Immunol* 2: 777-80, 2001.
- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. **Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4828-32, 1990.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. **Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro.** *Endocrinology* 139: 1329-37, 1998.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. **Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597-602, 1998.

- Yu-Lee LY. **Molecular actions of prolactin in the immune system.** *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 35-52, 1997.
- Zermeno C, Guzman-Morales J, Macotella Y, Nava G, Lopez-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, de la Escalera GM, Clapp C. **Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation.** *J Endocrinol* 189: R1-8, 2006.
- Zhornitsky S, Yong VW, Weiss S, Metz LM. **Prolactin in multiple sclerosis.** *Mult Scler* 19: 15-23, 2013.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. **TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function.** *Nature* 453: 236-40, 2008.
- Zhu XH, Zellweger R, Ayala A, Chaudry IH. **Prolactin inhibits the increased cytokine gene expression in Kupffer cells following haemorrhage.** *Cytokine* 8: 134-40, 1996.
- Zizzo G, De Santis M, Bosello SL, Fedele AL, Peluso G, Gremese E, Tolusso B, Ferraccioli G. **Synovial fluid-derived T helper 17 cells correlate with inflammatory activity in arthritis, irrespectively of diagnosis.** *Clin Immunol* 138: 107-16, 2011.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes y origen celular del tejido óseo.	3
Figura 2. Estructura general de una articulación sinovial.	9
Figura 3. Componentes celulares de la membrana sinovial.	10
Figura 4. Inflamación articular en la AR.	14
Figura 5. Determinación de los niveles circulantes de PRL	36
Figura 6. La PRL reduce la inflamación de la articulación tibio-tarsal en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	37
Figura 7. La PRL reduce la expresión de mediadores de inflamación en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	37
Figura 8. La artritis inducida por adyuvante completo de Freund (AIA) induce la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en la articulación tibio-tarsal.	38
Figura 9. La PRL reduce los niveles circulantes de proteína C-reactiva y TNF α en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	39
Figura 10. La PRL reduce la expresión de citocinas producidas por células colaboradoras Th17 en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	39
Figura 11. La PRL reduce la expresión de citocinas producidas por células T reguladoras en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	40
Figura 12. Efecto de la PRL sobre la disminución de hueso trabecular en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	41
Figura 13. Efecto de la PRL sobre la actividad de osteoclastos en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	42
Figura 14. La PRL reduce la expresión de mediadores de erosión ósea en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	42
Figura 15. La PRL reduce la expresión de marcadores de osteoclastos en la articulación tibio-tarsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA).	43
Figura 16. La falta del receptor de PRL produce mayor inflamación de la articulación tibio-femoral en ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA).	44
Figura 17. La expresión de mediadores de inflamación se incrementa en la articulación tibio-femoral del ratón deficiente del receptor de PRL sujeto a artritis monoarticular inducida por	44

adyuvante (MAIA).

Figura 18. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión de citocinas producidas por células colaboradoras Th17 en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 45

Figura 19. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión de citocinas producidas por células T reguladoras en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 45

Figura 20. La falta del receptor de PRL reduce el área de hueso trabecular en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 46

Figura 21. La falta del receptor de PRL aumenta la osteoclastogénesis en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 47

Figura 22. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión del mRNA de mediadores de erosión ósea en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 47

Figura 23. La falta del receptor de PRL aumenta la expresión del mRNA de marcadores de osteoclastos en la articulación tibio-femoral de ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (MAIA). 48

Figura 24. Las citocinas proinflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, IL-1 β e $IFN\gamma$) inducen la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL (PRLR) en la membrana sinovial. 49

Figura 25. Las citocinas proinflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, IL-1 β e $IFN\gamma$) inducen la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL (PRLR) en fibroblastos sinoviales. 49

Figura 26. La PRL reduce la expresión de factores osteoclastogénicos inducida por una combinación citocinas proinflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, IL-1 β e $IFN\gamma$) en fibroblastos sinoviales 50

Figura 27. La PRL bloquea la expresión de *Tnfrsf11* en fibroblastos sinoviales a través de la activación de la vía de STAT3 51

Figura 28. La PRL reduce la osteoclastogénesis inducida por citocinas proinflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, IL-1 β e $IFN\gamma$) en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos. 52

Figura 29. Osteoclastogénesis inducida por citocinas proinflamatorias (Cyt: $TNF\alpha$, IL-1 β e $IFN\gamma$) en co-cultivos de fibroblastos sinoviales y células progenitoras de osteoclastos provenientes de 53

ratones silvestres (*Prlr+/+*) o ratones deficientes del receptor de PRL (*Prlr-/-*).

Figura 30. Expresión del mRNA del receptor de PRL en condrocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos sinoviales. **54**

XI. ÍNDICE DE TABLAS

Table 1. Oligonucleótidos. Secuencias utilizadas para la cuantificación de la expresión de mediadores de inflamación para rata y ratón mediante qRT-PCR. **35**

PUBLICACIONES

Ledesma-Colunga MG, Adán N, Ortíz, G, Solís-Gutiérrez M, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2017).19(1):93

Clapp C, Adán N, **Ledesma-Colunga MG**, Solís-Gutiérrez M, Triebel J, Martínez de la Escalera G. The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci.* (2016). 73(15):2929-48. Review

Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, Arnold E, Vázquez-Membrillo M, Arredondo-Zamarripa D, **Ledesma-Colunga MG**, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Lab Invest.* (2016). 96(3):283-95

Lemini M, Ruiz-Herrera X, **Ledesma-Colunga MG**, Díaz-Lezama N, De Los Ríos EA, López-Barrera F, Méndez I, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2015). 308(9):R792-9.

Arredondo Zamarripa D, Diaz-Lezama N, Meléndez García R, Chavez Balderas J, Adan N, **Ledesma-Colunga MG**, Arnold E, Clapp C, Thebault T. Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* (2014). 20; 8:333.

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 vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology.* (2014). 44:123-32. *Equal Contribution

Adán N, **Ledesma-Colunga MG**, Reyes-López AL, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Arthritis and prolactin: A phylogenetic viewpoint. *Gen Comp Endocrinol.* (2014). 203:132-6. Review

Adán N*, Guzmán-Morales J*, **Ledesma-Colunga MG***, Perales-Canales SI, Quintanar-Stéphano A, López-Barrera F, Méndez I, Moreno-Carranza B, Triebel J, Binart N, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Clapp C. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* (2013). 123 (9):3902-13. *Equal Contribution

CONGRESOS

- 2012-06 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Quintanar-Stephano A, Thébault S, Martínez de la Escalera G y Clapp C. Haloperidol-induced hyperprolactinemia counteracts joint inflammation in Adjuvant-Induced Arthritis in rats. The Endocrine Society's 94th Annual Meeting. Houston, Texas. June 23-26, 2012.
- 2012-07 Adán N, Guzmán-Morales J, **Ledesma-Colunga MG**, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Clapp C. Prolactin inhibits chondrocyte apoptosis and Joint inflammation induced by pro-inflammatory cytokines and arthritis in rats. , Growth Hormone and Prolactin Family in Health and Disease. FASEB Research Conference. Silvertree, Snowmass Village, Colorado. July 08-13, 2012.
- 2013-05 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Méndez I, Quintanar-Stephano A, Martínez de la Escalera, G, Clapp C. Prolactin reduces joint inflammation in adjuvant-induced arthritis in rats. Second meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology. May 22-25, 2013.
- 2013-05 Adán N, Guzmán-Morales J, **Ledesma-Colunga MG**, López-Barrera F, Quintanar-Stephano A, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Clapp C. Prolactin inhibits chondrocyte apoptosis induced by pro-inflammatory cytokines and arthritis in rats. Second meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology. May 22-25, 2013.
- 2013-06 Adán N, Guzmán-Morales J, **Ledesma-Colunga MG**, López-Barrera F, Quintanar-Stephano A, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Clapp C. Prolactin inhibits chondrocyte apoptosis in the adjuvant-induced model of rheumatoid arthritis in rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting. San Francisco California. June 15-18, 2013.
- 2014-05 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Méndez I, Quintanar-Stephano A, Martínez de la Escalera, G, Clapp C. La prolactina reduce la inflamación articular en el modelo de

artritis inducida por adyuvante en la rata. XXI Congreso Nacional de Inmunología, Querétaro, México. May 6-10, 2014. *Presentación Oral*.

2014-11 Adán N, **Ledesma-Colunga MG**, Reyes-López AL, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, y Clapp C. Deletion of the prolactin receptor aggravates the course of antigen-induced arthritis. Annual Meeting of the American College of Rheumatology. Boston, Massachusetts, EUA. November 14-19, 2014.

2014-11 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Reyes-López AL, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, y Clapp C. Prolactin reduces bone erosion in adjuvant-Induced arthritis. Annual Meeting of the American College of Rheumatology. Boston, Massachusetts, EUA. November 14-19, 2014.

2017-01 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Ortiz G, Solis-Gutierrez M, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin protects against joint inflammation and bone loss in experimental arthritis. The Endocrine Society's 99th Annual Meeting. Orlando, FL, EUA. January, 1-4, 2017. *Presentación Oral*.
Memorial Travel Grant. Mara E. Lieberman.

2017-01 **Ledesma-Colunga MG**, Adán N, Ortiz G, Solis-Gutierrez M, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin reduces the loss of bone due to arthritis. KNOCK-OUT ROUNDS. *Presentación Oral*. The Endocrine Society's 99th Annual Meeting. Orlando, FL, EUA. January 1, 2017.