



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE
SINOVIOCIDOS TIPO FIBROBLASTO CULTIVADOS BAJO
CONDICIONES DE INFLAMACIÓN”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSE FERNANDO GARCÍA RODRIGO

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**DR. GERARDO ROJAS PILONI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO
JUNIO, 2020**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante mis estudios.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por otorgar las facilidades y equipamiento necesarios para la realización de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora y a la M. en C. María Georgina Ortiz Arballo, responsables de la dirección de este proyecto y de las ideas aquí vertidas.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, titular del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, lugar donde se realizó este trabajo.

A la Dra. Janette Furuzawa Carballeda y al Dr. Gerardo Rojas Piloni, miembros de mi comité tutorial, quienes aportaron valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera, técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su soporte técnico.

Al Lic. Fernando López Barrera, técnico académico del Laboratorio de Endocrinología Molecular, por su soporte técnico.

A los laboratoristas Antonio Prado y Daniel Mondragón, por toda su ayuda en el proceso de desarrollo de este trabajo.

A la unidad de bioterio, en especial a la Dra. Alejandra Castilla León, al M.V.Z. José Martín García Servín y a la Dra. María Antonieta Carbajo Mata, por su asistencia técnica, manejo y cuidado de los animales de experimentación.

A la unidad de enseñanza y posgrado, a la Dra. Nuri Aranda López por su invaluable ayuda en trámites académicos y aclaración de dudas, sin dejar de lado la importante labor de las secretarías, en especial a María del Carmen Mendoza López.

A la biblioteca del campus, la unidad de cómputo y la unidad de video conferencias del Instituto de Neurobiología, en especial a María de Lourdes Lara Ayala.

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune con efectos articulares y sistémicos. Se caracteriza por la hiperplasia de la membrana sinovial debido a la proliferación de células residentes (sinoviocitos) y a la infiltración de células inmunes que generan un tejido invasivo (pannus) que causa la degradación del cartílago y el hueso. En la AR, los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) proliferan, migran y producen mediadores inflamatorios en respuesta a citocinas proinflamatorias. La interleucina-1 β (IL-1 β) desempeña un papel preponderante en la activación de los STF en la AR y la hormona prolactina (PRL) reduce la formación del pannus y la destrucción articular en modelos murinos de AR. Dado que los STF expresan el receptor de PRL (PRLR), en este estudio investigamos si la PRL modifica el efecto proinflamatorio de la IL-1 β a través de evaluar la actividad metabólica (evaluada por el ensayo MTT), la expresión de mediadores inflamatorios, la activación de la vía de señalización NF-kB y la proliferación de STF cultivados en presencia o ausencia de IL-1 β . Se obtuvieron cultivos primarios de STF altamente (99%) enriquecidos. La IL-1 β estimuló la expresión del PRLR en los STF y la PRL inhibió el efecto de la IL-1 β sobre: (a) la actividad metabólica; (b) la expresión de mediadores proinflamatorios IL-1 β , interleucina-6 (IL-6) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS); y (c) la activación de NF-kB mediada a través de su translocación nuclear. El tratamiento con IL-1 β redujo la proliferación de los STF y la PRL no modificó este efecto. Estos resultados muestran que la PRL bloquea acciones proinflamatorias de la IL-1 β sobre los STF y, por ende, que estas células pueden ser blanco de los efectos protectores de la PRL en la AR.

A la unidad de Microscopia, principalmente a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su apoyo y soporte técnico.

A la Unidad de Proteogenómica, especialmente a la M. en C. Adriana González Gallardo, por su asistencia técnica.

Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive inflammatory autoimmune disease with articular and systemic effects. Central to RA is the hyperplasia of the synovial membrane due to the proliferation of resident cells (synoviocytes) and the infiltration of immune cells that results in an inflamed invasive tissue (pannus) causing cartilage degradation and bone destruction. In RA, the fibroblast-like synoviocytes (FLS) proliferate, migrate, and produce inflammatory mediators in response to proinflammatory cytokines. Interleukin-1 β (IL-1 β) stands among pro-inflammatory cytokines activating FLS in RA and the hormone prolactin (PRL) reduces pannus formation and joint destruction in rodent models of RA. Because FLS express PRL receptor (PRLR), here we investigate whether PRL modifies the IL-1 β -induced metabolic activity (evaluated by the MTT assay), expression of inflammatory mediators, the NF- κ B pathway and the proliferation of cultured FLS obtained from mouse joints. Cultures were highly enriched (99%) in FLS. Treatment with IL-1 β increased the metabolic activity of FLS. IL-1 β increased the expression of the PRLR in the FLS and PRL inhibited the IL-1 β -induced increase in: (a) the metabolic activity; (b) the expression of pro-inflammatory mediators IL-1 β , interleukin-6 (IL-6), and inducible nitric oxide synthase (iNOS); and the activation of NF- κ B revealed by its nuclear translocation. However, PRL did not modify the IL-1 β -induced reduction of FLS proliferation. Our findings show that PRL blocks pro-inflammatory effects of IL-1 β on FLS and, thereby, suggest that these cells are targets of the protective action of PRL in RA.

Índice

Resumen	i
Summary	ii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Artritis reumatoide	2
2.2 Membrana sinovial y artritis reumatoide.....	4
2.3 Sinoviocitos tipo fibroblasto y artritis reumatoide	5
2.3.1 Sinoviocitos tipo fibroblasto y mediadores proinflamatorios	7
2.3.2 Interleucina 1 β	8
2.4 Prolactina	9
2.4.1 Prolactina y artritis reumatoide	11
3. Justificación	12
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos	13
5.1 General.....	13
5.2 Particular.....	13
6. Materiales y métodos	14
6.1 Animales	14
6.2 Extracción de sinoviocitos tipo fibroblasto	14
6.3 Caracterización de los cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto	15
6.4 Medición de la actividad metabólica mediante ensayo de MTT	15
6.5 Expresión de marcadores de inflamación	16
6.5.1 Extracción de RNA.....	16
6.5.2 Síntesis de cDNA	16

6.5.3 qRT-PCR.....	16
6.6 Ensayo de translocación nuclear de NF-kB.....	17
6.7 Ensayo de proliferación.....	18
6.8 Análisis estadístico.....	18
7. Resultados.....	19
7.1 Los cultivos celulares están enriquecidos en sinoviocitos tipo fibroblasto	19
7.2 La prolactina reduce el aumento en la actividad metabólica inducido por IL-1 β	21
7.3 La IL-1 β aumenta la expresión génica del receptor de prolactina.....	24
7.4 La prolactina reduce el aumento en la expresión génica de IL-1 β , IL-6 e iNOS inducidas por IL-1 β	25
7.5 La prolactina no modifica la expresión génica de metaloproteasas inducidas por IL-1 β	26
7.6 La prolactina reduce la translocación nuclear de NF-kB inducida por IL-1 β	27
7.7 La IL-1 β reduce la proliferación de sinoviocitos tipo fibroblasto y este efecto no se ve modificado por la prolactina.....	29
8. Discusión.....	31
9. Conclusiones.....	37
10. Bibliografía.....	38
11. Índice de figuras.....	49
11. Índice de tablas.....	51

1. Introducción

Las artritis inflamatorias comprenden un grupo de padecimientos que afectan las articulaciones móviles, la columna vertebral y otras estructuras corporales. Dentro de las artritis inflamatorias destaca por su prevalencia [1% de la población mundial (1) y 1.6% en México (2)] la artritis reumatoide (AR), una enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune que afecta principalmente las articulaciones, causando dolor, hinchazón, destrucción del hueso y del cartílago (3, 4). La etiología de la AR es multifactorial, pero se considera que una combinación de factores genéticos y epigenéticos determina el que estímulos no identificados resulten en el reclutamiento de células inmunes a la articulación y la proliferación de células sinoviales. La producción de autoanticuerpos (anticuerpos producidos por el sistema inmune que actúa en contra de antígenos del propio individuo), la activación, proliferación e interacción de células inmunes y sinoviocitos, así como la angiogénesis del tejido sinovial sostienen el desarrollo de un frente inflamatorio (pannus) que invade y ocasiona la destrucción del cartílago y del hueso (5-7). La AR afecta predominantemente a las mujeres (con una relación 3:1 frente a los hombres), lo que sugiere que hormonas ligadas al sexo juegan un papel fundamental en la aparición y desarrollo de esta enfermedad (1, 8). Entre estas hormonas se encuentra la prolactina (PRL), una hormona sexualmente dimórfica que posee acciones sobre tejidos de la articulación y sobre células inmunes (9). Estudios recientes muestran que la PRL reduce la formación del pannus y la destrucción del hueso y del cartílago en modelos experimentales de AR (4, 10). En este estudio hemos profundizado en las acciones protectoras de la PRL a través de evaluar efectos directos sobre la actividad metabólica, la expresión de mediadores proinflamatorios y la proliferación de sinoviocitos cultivados bajo condiciones de inflamación.

2. Antecedentes

2.1 Artritis reumatoide

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que está asociada con efectos tanto sistémicos como articulares (11). La AR se caracteriza por una inflamación articular crónica que daña componentes articulares como lo son el cartílago y el hueso, además de causar complicaciones sistémicas a nivel cardiovascular, pulmonar, dermatológico y neurológico entre otros. Se ha reportado que alrededor del 1% de la población mundial padece de esta enfermedad que al no ser tratada conlleva a la pérdida de la capacidad locomotora, reducción de la calidad de vida así como al aumento en morbilidad y mortalidad (1).

La etiología de la AR aún no es clara, sin embargo, la evidencia sugiere que la participación de factores tanto genéticos como epigenéticos desencadenan una respuesta inmune aberrante activando células T y B y propiciando la producción de citocinas proinflamatorias que, vía la infiltración de células inmunes a la cavidad articular, la proliferación de células sinoviales residentes y la angiogénesis, conducen a la inflamación del sinovio y, consecuentemente, a la destrucción del cartílago y del hueso (12).

Dentro de las variables epigenéticas y ambientales determinantes de la AR se incluyen el tabaquismo, el tipo de dieta (alto consumo de alcohol, carnes rojas y sodio (12, 13)), las enfermedades infecciosas y la microbiota oral e intestinal (14, 15). Estos factores difieren en su mecanismo de acción pero tienen en común la generación de proteínas citrulinadas, las cuales son reconocidas como antígenos por el organismo generando una respuesta autoinmune (16). Los factores genéticos también son importantes en el desarrollo de la AR ya que estudios en gemelos monocigóticos estiman que hay una predisposición a desarrollar este padecimiento en un 50% de los casos (17, 18).

Una de las regiones del genoma que se ha visto fuertemente relacionada con la AR es el *locus* del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH II), conocido como el antígeno leucocitario humano II (HLA II), cuyos polimorfismos, específicamente el denominado como “epítipo compartido en AR” (RA-shared epitope), se correlaciona con la presencia del factor reumatoide, la presencia de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas, o ambas (19). Sin embargo, este polimorfismo está ausente en el 20-30% de los pacientes con AR (19, 20). Otros polimorfismos asociados a la AR incluyen el *PTPN22*, *TRAF1-C5*, *STAT4* y *PADI4* (9, 11, 15, 21), sin embargo, el riesgo de desarrollar AR por presentar polimorfismos genéticos es bajo a menos que se combinen con factores ambientales, como por ejemplo el fumar (22) o por factores relacionados con el mismo individuo como lo es el estrés, el sexo y la reproducción (9).

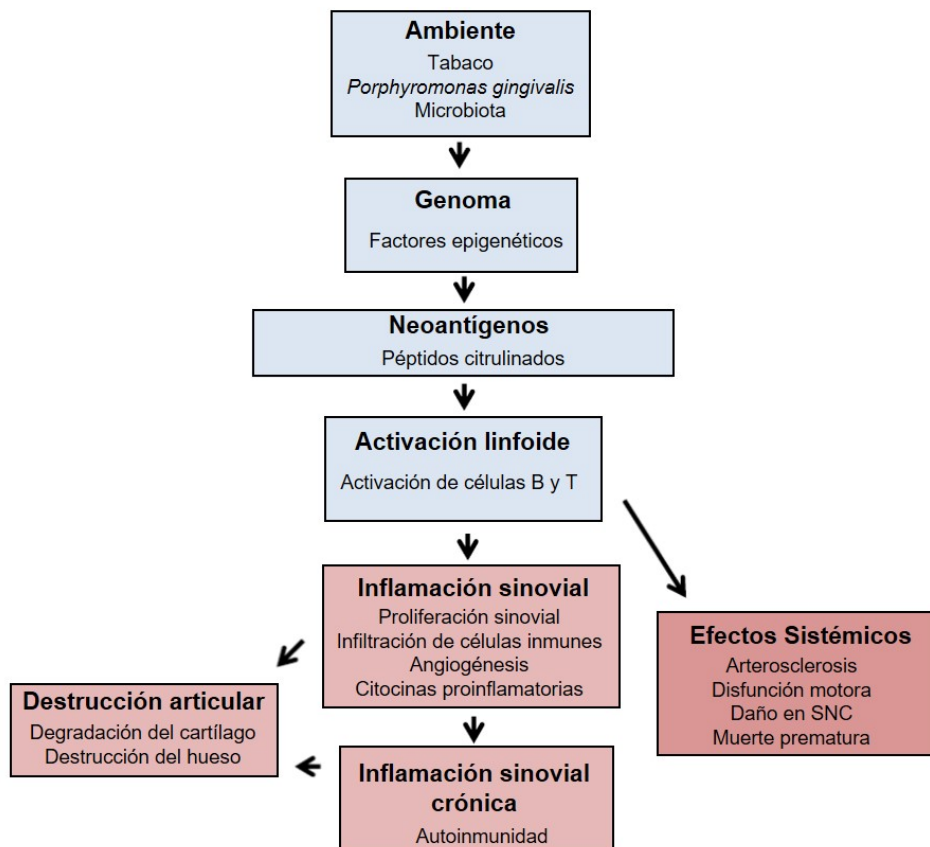


Figura 1. Fisiopatología de la artritis reumatoide. (modificado de Boissier et al, 2012)

2.2 Membrana sinovial y artritis reumatoide

La membrana sinovial es el principal componente de la articulación que origina el proceso inflamatorio en la AR; esta estructura se encarga de recubrir la articulación y producir el líquido sinovial que nutre y lubrica sus superficies móviles. De manera normal consta de una capa de 2 a 3 células de grosor que comprende 2 tipos celulares diferentes en un estado quiescente de proliferación, los sinoviocitos tipo macrófago y los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) (23). Los primeros derivan de la médula ósea y migran al tejido sinovial para convertirse en células residentes y los STF se encargan de producir componentes del líquido sinovial como el ácido hialurónico y la lubricina (24).

En la AR, las células de la membrana sinovial se tornan hiperplásicas y se promueve su supervivencia (23). La formación del pannus (Figura 2), un tejido invasivo formado por ambos tipos de sinoviocitos, células inmunes y vasos sanguíneos, es en gran medida resultado de la acción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 beta (IL-1 β) (25). Estas citocinas, al mismo tiempo que promueven la activación, proliferación, migración y angiogénesis del pannus (26, 27), estimulan que este tejido invasivo produzca proteasas y factores inflamatorios (óxido nítrico y citocinas proinflamatorias) que resultan en la degradación del cartílago y hueso (4, 10, 24). Debido a la importancia de las citocinas proinflamatorias en el desarrollo de la AR, se han desarrollado fármacos cuyo objetivo se centra en inhibir su acción y que incluyen al *Infliximab*, *Tocilizumab* y *Anakinra* que son anticuerpos que bloquean la acción de $TNF\alpha$, la IL-6 y la IL-1 β respectivamente (3), sin embargo el uso de estos fármacos no ha sido la solución puesto que un gran número de pacientes no responden de manera favorable al tratamiento dada la complejidad de la enfermedad (3, 25).

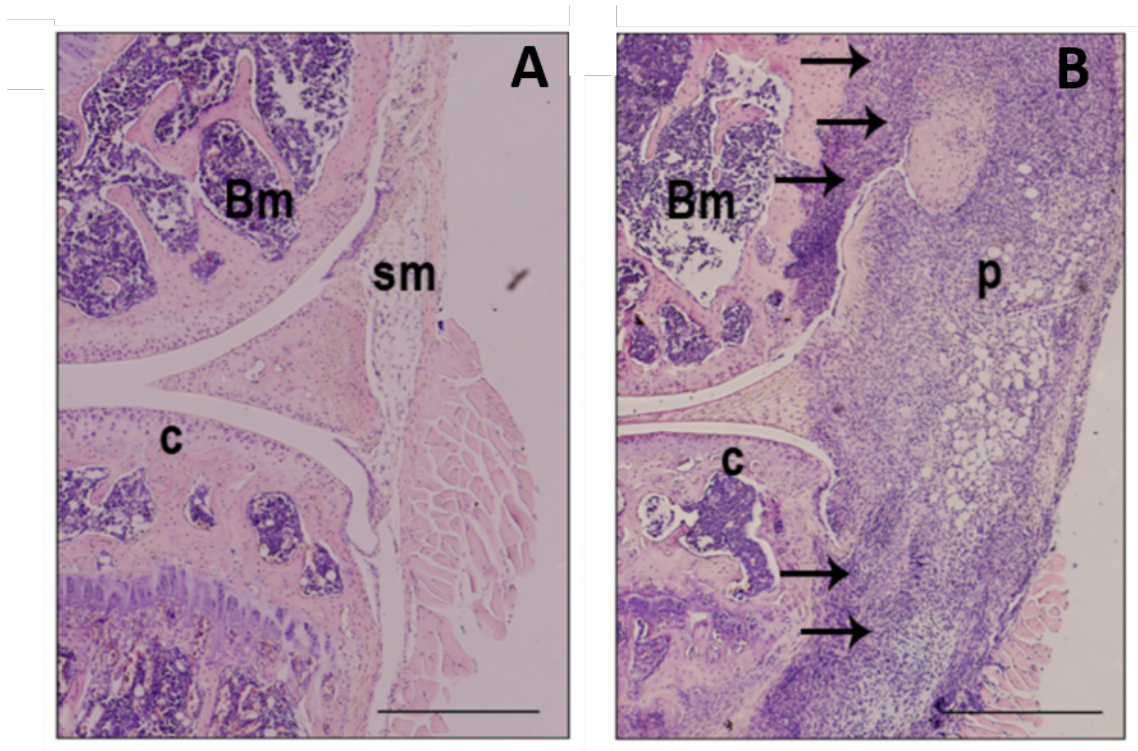


Figura 2. Histología sagital de la articulación femoro-tibial de ratón control (A) vs ratón artrítico (B) teñido con hematoxilina eosina. Las flechas muestran la invasión del pannus a estructuras de la articulación. P: pannus, C: cartilago, sm: membrana sinovial, Bm: medula ósea. Barra de calibración = 500 μ m. (Ortiz et al, 2020)

2.3 Sinoviocitos tipo fibroblasto y artritis reumatoide

Los sinoviocitos son células protagónicas para el inicio y progresión de la AR. En particular, los STF son de gran relevancia dada su capacidad proliferativa, migratoria y de producción de mediadores proinflamatorios bajo condiciones de inflamación.

Los STF, también conocidos como sinoviocitos tipo B, se encuentran en la capa íntima de la membrana sinovial y constituyen el mayor porcentaje de células residentes bajo condiciones normales (28). Tienen un origen mesenquimal y comparten características de fibroblastos al expresar marcadores como CD-90, vimentina, colágeno, entre muchos otros (23). Su función principal es sintetizar líquido sinovial a la cavidad articular para lubricar la articulación y nutrir al cartilago

que es avascular (29). Los STF también son conocidos por sus propiedades centinela ya que a través de censar el ambiente inflamatorio en que se encuentran, comienzan a secretar moléculas quimioatrayentes (quimiocinas como CXCL5, CXCL10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, etc (23)) las cuales reclutan leucocitos y macrófagos a la cavidad articular generando así una acumulación de células tanto inmunomoduladoras como fagocíticas propiciando el mantenimiento de la inflamación sinovial (24).

En la AR, hay un aumento masivo de las células del sinovio (Figura 3), influida por la hiperplasia de los STF (30). El mecanismo de la acumulación de estas células en patologías como la AR es aún incierto, pero se piensa que su promoción en gran medida se debe a la acción de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , INF γ , IL-6, IL-17, entre otras (23)) tanto sistémicas como provenientes de la infiltración de células inmunes las cuales modifican el metabolismo celular promoviendo su crecimiento y diferenciación así como generando un desbalance a favor de los factores que induzcan su proliferación y supervivencia; un ejemplo claro de esto es la alteración en la función de la proteína p53 en STF de pacientes con AR, donde se ha reportado un aumento en su crecimiento, proliferación y supervivencia (23, 31, 32).

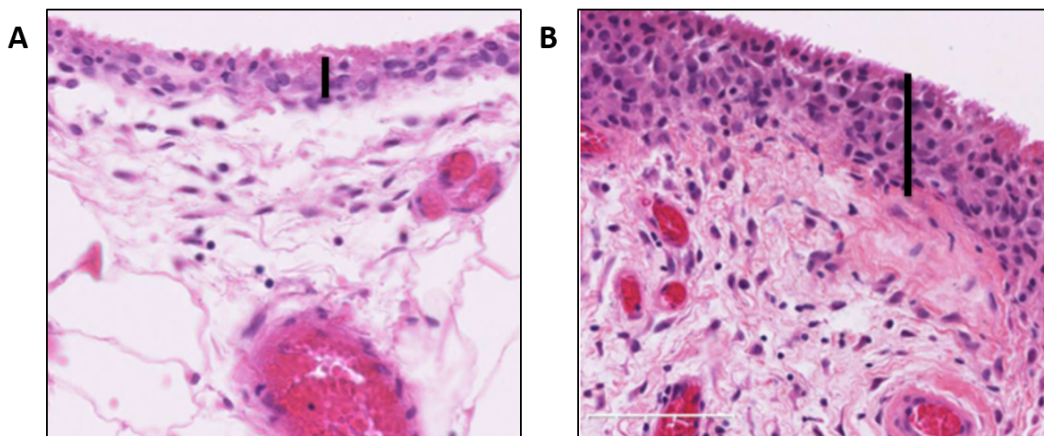


Figura 3. Histología sinovial humana de pacientes sanos (A) vs pacientes artríticos (B) teñido con hematoxilina eosina. Las líneas verticales muestran el grosos de la membrana sinovial. Barra de calibración = 100 μ m. (Bustamante et al, 2017)

2.3.1 Sinoviocitos tipo fibroblasto y mediadores proinflamatorios.

La presencia de una red compleja de mediadores proinflamatorios con efectos en los diferentes componentes celulares de la articulación es la causa de la dificultad para combatir los efectos adversos presentes en esta patología (33). Dentro de esta red compleja de mediadores proinflamatorios, los STF juegan un papel esencial gracias a que además de producir quimiocinas tienen la capacidad de secretar una gran variedad de citocinas y mediadores inflamatorios (Tabla 1) los cuales ejercen un efecto pleiotrópico en macrófagos, linfocitos T y B, células mesenquimales, hueso y cartílago (34).

Moléculas efectoras producidas por STF	
Función	Moléculas efectoras
Angiogénesis	IL-8, TGF- β , PDGF, GM-CSF, G-CSF, FGF, VEGF, EGF
Quimiocinas	IL-8, IL-16, MCP-1, MIP-1 α
Proinflamatoria	IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, LIF, PDGF, MIF, GM-CSF, TRX, iNOS
Osteoclastogenesis	RANKL, VEGF
Degradación de matriz	PGE ₂ , collagenase, stromelysin, gelatinase, cathepsins

Tabla 1. Moléculas efectoras producidas por STF. EGF: factor de crecimiento epidermal, FGF: factor de crecimiento de fibroblasto, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL: Interleucina, LIF: Factor inhibidor de leucemia, MIF: factor inhibidor de macrófagos, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, RANKL: receptor de la actividad del ligando NF- κ B, TRX: tioredoxina, iNOS: sintetasa inducible de óxido nítrico, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (modificado de Ritchlin et al, 2000).

Además, los STF expresan una gran variedad de receptores de superficie como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-a y b), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs), de citocinas como IL-1 β , el TNF- α , de moléculas de adhesión como la ICAM-1 y VCAM-1, de hormonas como la PRL, entre muchos otros más (4, 23, 35). Esta gran variedad de receptores les permite pensar y responder ante alteraciones del ambiente articular. Un ejemplo claro de esto es

cuando, en respuesta a las citocinas proinflamatorias $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $INF\gamma$, los STF producen estas mismas citocinas y otras más como la $IL-6$ (4), así como metaloproteasas de matriz (MMP) (6) lo cual conlleva a la migración, invasión y degradación de los componentes de la articulación por el pannus.

2.3.2 Interleucina 1 β

La $IL-1\beta$ es considerada una de las citocinas claves para el desarrollo de la AR, debido a su alta capacidad de inducir reacciones inflamatorias de manera independiente o combinada con algunas otras citocinas proinflamatorias (36). Muchos de los componentes articulares son capaces de sintetizar esta citocina e incluyen a los condrocitos, los osteoblastos, las células inmunes, los macrófagos y los STF (37, 38).

Se ha reportado que los STF tienen una elevada capacidad para sintetizar $IL-1\beta$ ya que en patologías como la osteoartritis, donde la infiltración de células inmunes a la cavidad articular es muy baja en etapas tempranas de la enfermedad (39), los STF parecen ser las principales células sinoviales encargadas de producir este mediador inflamatorio (40).

Las acciones directas de la $IL-1\beta$ sobre los STF modifican tanto su proliferación como la producción de mediadores proinflamatorios ($IL-6$, $IL-1\beta$, $MMP1$, -2, -3, -8, -9, -13, etc) (41, 42) a través de la activación de vías de señalización entre las que sobresalen la de $NF-kB$ (43) y la de las $MAPK$ (44) (Figura 4).

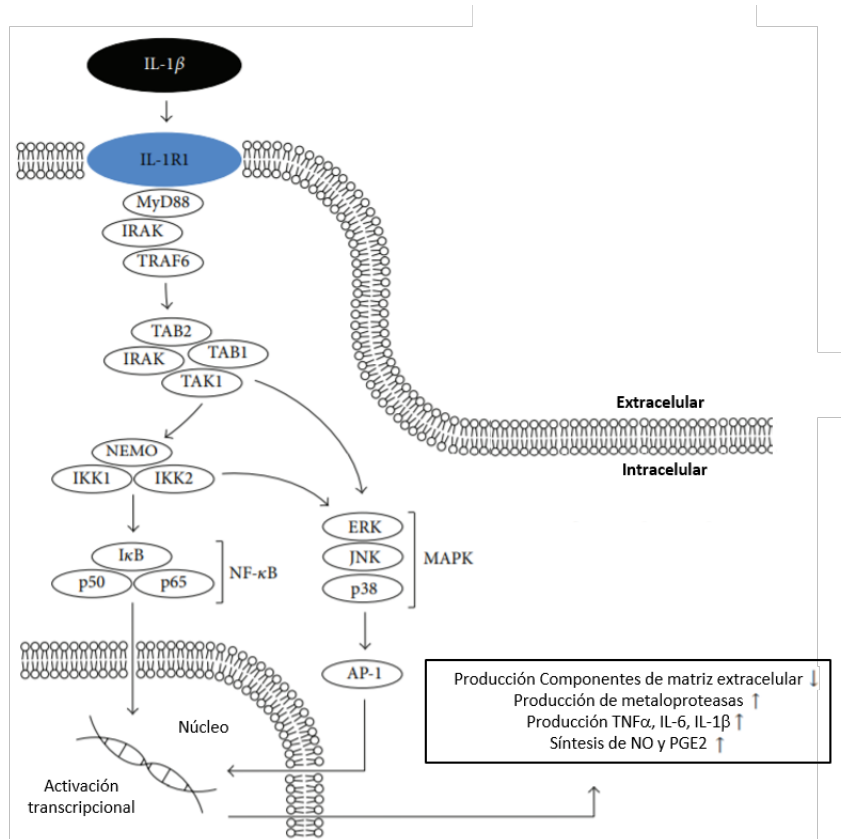


Figura 4. Vía de señalización intracelular de IL-1 β . La interacción de IL-1 β con su receptor desencadena una cascada de señalización que mediante la fosforilación de diferentes proteínas finaliza con la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 responsables de inducir diferentes respuestas celulares. La interacción de NF- κ B y AP-1 con el ADN se traduce en un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios. (Modificado de Wojdasiewicz et al, 2014)

2.4 Prolactina

La PRL es una hormona proteica de 199 aminoácidos que es sintetizada y secretada por las células lactotróficas de la adenohipófisis. Esta hormona ejerce una multiplicidad de efectos dentro y fuera de la esfera reproductiva que incluyen acciones sobre el crecimiento, el metabolismo, la osmorregulación, el comportamiento, la función neural, la angiogénesis y la respuesta inmune (9, 45-49).

Las acciones que ejerce la PRL son mediadas a través de la interacción con su receptor, el cual pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1.

Estos tipos de receptores se caracterizan por tener 3 dominios estructurales, uno extracelular, uno transmembranal y uno intracelular (47).

La señalización de la PRL se inicia a partir de la dimerización del receptor de la PRL gracias a la presencia de dos sitios de unión en la molécula de la hormona; consecuentemente se activa una cinasa de tirosina conocida como JAK2 (*Janus Kinase 2*) que fosforila residuos de tirosina en la porción intracelular del receptor, lo que permite el anclaje y posterior fosforilación/activación (por JAK2) de factores de transcripción STAT (*Signal Transduction Activators of Transcription*) que conlleva a su dimerización y translocación al núcleo donde los dímeros STAT promueven la activación de genes asociados a proliferación, diferenciación y supervivencia (47). Si bien JAK-STAT es la vía canónica de acción de la PRL (47, 50), otras vías de señalización como la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la de la fosfoinositol 3-quinasa / Akt (PI-3K / Akt) también contribuyen a sus efectos (47, 51) (Figura 5).

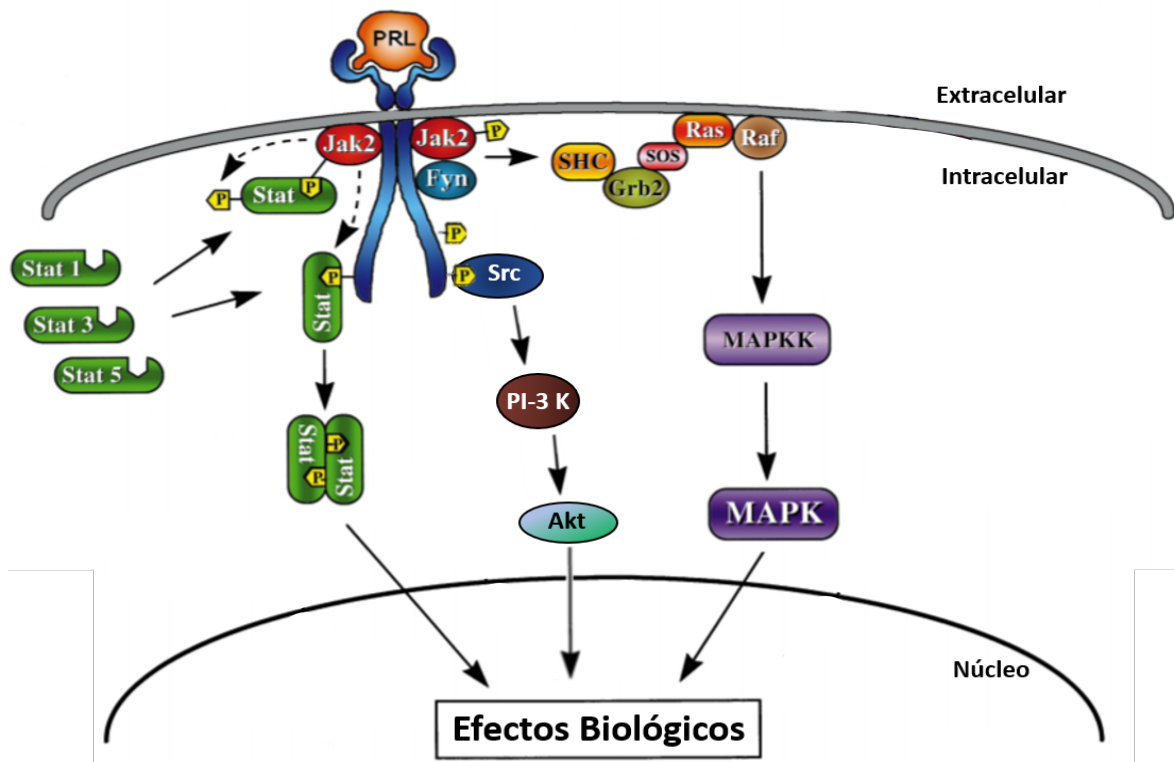


Figura 5. Vía de señalización de PRL. (Modificado de Bole-Feysot et al, 1998)

2.4.1 Prolactina y artritis reumatoide

Estudios previos han abordado la relación entre la PRL y la AR. La evidencia sugiere que la PRL estimula la respuesta inmune y que sus niveles séricos se incrementan en la circulación de algunos pacientes con AR (52), sin embargo, no se ha observado una correlación clara entre los niveles de PRL y la severidad del padecimiento (53). Por ejemplo, hay estados de hiperprolactinemia fisiológica (embarazo) que se caracterizan por la regresión de la AR (54), no obstante, durante la lactancia, los altos niveles circulantes de PRL se han asociado tanto con un aumento en la severidad de la AR (55) como con un incremento en el riesgo de presentar la enfermedad en mujeres lactantes después del primer embarazo (56). Sin embargo, existen algunos estudios que muestran un efecto protector de la PRL en el desarrollo de la AR (57). Esta dualidad de efectos se ha puesto de manifiesto con el uso de agonistas y antagonistas dopaminérgicos que reducen y elevan los niveles circulantes de PRL, donde se han reportado resultados controversiales sobre la progresión de la AR (9).

Con respecto a las acciones antiinflamatorias de la PRL (58), estudios recientes en modelos experimentales de AR mostraron un valor protector de la hiperprolactinemia. El tratamiento con PRL redujo la producción articular de citocinas proinflamatorias ($\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 y IL-1 β), el dolor, la inflamación de la articulación y la apoptosis de los condrocitos (10), así como la generación de osteoclastos y la destrucción del hueso (4). Algunas de estas acciones parecen deberse a efectos directos de la PRL sobre los STF. Se encontró que la combinación de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$ e IL-1 β estimula la expresión del receptor de la PRL en cultivos primarios de STF y que el tratamiento con PRL reduce el efecto de estas citocinas sobre su autoproducción en los STF (4). Sin embargo, se desconoce cuál de estas tres citocinas es antagonizada por la PRL y si dicho antagonismo se traduce en efectos directos sobre la actividad metabólica, la producción de mediadores de inflamación y proliferación de los STF. Este estudio se enfocó a analizar el antagonismo funcional de la PRL y la IL-1 β en cultivos primarios de STF.

3. Justificación

La AR es una patología de alta prevalencia (1% de la población mundial (1) y 1.6% en México (2)) que afecta de manera significativa la calidad de vida de aquellos pacientes que la padecen, por lo que el mayor conocimiento de factores capaces de modificar su fisiopatología tiene relevancia clínica. En la actualidad, los fármacos utilizados para tratar la artritis se han centrado principalmente en inhibir la acción de algunos mediadores proinflamatorios como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ o $IL-6$ (59, 60), pero debido a la complejidad de esta patología su efectividad no ha sido del todo clara, por lo que la búsqueda de nuevos factores con potencialidad terapéutica es necesaria. Es posible que la hormona PRL forme parte de estos factores.

Estudios recientes han reportado que la PRL protege contra la destrucción del cartílago y el hueso (4, 10) en modelos murinos de artritis experimental y que los STF expresan el receptor de PRL (4). En este proyecto profundizamos sobre los efectos protectores de la PRL a través de analizar su acción directa sobre STF en cultivo en ausencia o presencia de la citocina proinflamatoria $IL-1\beta$.

4. Hipótesis

La PRL actúa sobre los STF reduciendo los efectos proinflamatorios de la IL-1 β a través de inhibir la actividad transcripcional de NF-kB.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar los efectos de la PRL en la respuesta inflamatoria y en la activación de NF-kB mediada por IL-1 β .

5.2 Particular

- 1) Aislar cultivos primarios de STF murinos.
- 2) Evaluar el efecto de la IL-1 β sobre la actividad metabólica, la expresión de mediadores proinflamatorios y la proliferación de los STF en cultivo.
- 3) Evaluar si la PRL modifica los efectos de la IL-1 β sobre la actividad metabólica, la expresión de mediadores proinflamatorios y la proliferación de los STF en cultivo
- 4) Determinar si la PRL modifica la activación de NF-kB inducida por IL-1 β en los STF en cultivo

6. Materiales y métodos

6.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 4 a 6 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de luz (ciclos de luz oscuridad de 12 horas cada uno), temperatura (22 °C) y alimento (*ad libitum*). Los animales se sacrificaron en una atmósfera saturada de CO₂. Los ratones fueron manipulados bajo las normas bioéticas (NOM-062-ZOO-1999) con el aval del Comité de Ética en la Investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM el cual aprobó todos los experimentos en animales bajo el proyecto con número 033.

6.2 Extracción de sinoviocitos tipo fibroblasto

Los STF se aislaron y cultivaron siguiendo el protocolo establecido (61). Las extremidades posteriores, a nivel de la articulación fémur/fibula/tibia se diseccionaron, lavaron y sumergieron en solución salina balanceada de Hank donde se removió todo el tejido alrededor del hueso (piel, tendón y músculo) teniendo la precaución de no lesionar el hueso para evitar una contaminación por células de la médula ósea. La articulación de la rodilla se abrió para exponer el tejido sinovial y se incubó en medio de cultivo (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alto en glucosa suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY, USA) inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomina (Invitrogen) adicionado con 2 mg/ml de colagenasa tipo IV (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) y 0.2 mg/ml de desoxiribonucleasa 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en agitación (300rpm) por 3 horas a 37°C. El tejido se agitó vigorosamente y el sobrenadante se filtró a través de una malla de 100 a 200 µm y se centrifugó a 1200 rpm por 10 min. El paquete celular se resuspendió en DMEM 20% SFB y se cultivó a 37°C y 5% de CO₂ hasta lograr su confluencia. Los sinoviocitos tipo fibroblastos se usaron en el pase 3 bajo una confluencia del 90-100% que es cuando muestran su fenotipo característico (CD90.2+, VCAM+, ICAM+ (62)).

6.3 Caracterización de los cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto

La caracterización por ensayo inmunocitoquímico se realizó siguiendo el protocolo reportado (62). Se sembraron 50,000 células en cubreobjetos redondos de 18 mm contenidos en placas de 12 pozos con 300 µl de DMEM 20% SFB. Una vez que se adhirieron las células (4 h), se agregó 200 µl de medio DMEM 20% SFB. Transcurridas 24 h, se retiró el medio y las preparaciones se lavaron con 500 µl de PBS. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 1 h a temperatura ambiente (T.A.), se permeabilizaron con metanol frío durante 10 min a -20 °C y se lavaron inmediatamente con PBS; se bloquearon con PBS + 0.05% Tritón X-100 + 1% BSA + 5% NGS durante 1 h a T. A., se lavaron con PBS y se incubaron por la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti CD-90.2 (1:250) (550543, BD Bioscience); posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500) (A21208, Invitrogen) durante 2 h a T. A. Por último, se retiró el anticuerpo secundario y las preparaciones se lavaron con PBS, se montaron en un portaobjetos con vectashield y se sellaron con barniz. Las imágenes se digitalizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX51, Japón) y se analizaron utilizando el programa ImageJ 1.X (63).

6.4 Medición de la actividad metabólica mediante el ensayo de MTT

El MTT es la forma oxidada (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de una sal de tetrazolio que al reducirse por acción de deshidrogenasas mitocondriales se convierte en formazan de color violeta. Este ensayo mide la actividad metabólica celular. Se sembraron 35,000 células por pozo en placas de 96 en DMEM 5% SFB, 24 h después se agregaron los tratamientos en DMEM 1% SFB durante 72 h. Todos los tratamientos de PRL + IL-1β se administraron de manera conjunta. Transcurrido este tiempo se adicionó 10 µl de MTT (Sigma Aldrich) (5mg/ml) y se les dejó incubando durante 4 h a 37°C. Posteriormente se retiró el medio, se adicionó 100 µl de SDS-HCl, se incubó por la noche y la coloración se midió a 570 nm. Los resultados de absorbancia se

normalizaron con respecto al grupo control y se representaron como veces de cambio.

6.5 Expresión de marcadores moleculares de inflamación

6.5.1 Extracción de RNA

Para extraer el RNA total se adicionó 500 µl de trizol (Invitrogen, Grand Island, NY) a cada pozo (placas de 12 pozos) y se recuperó el raspado celular en tubos eppendorf de 1.5 ml que se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para disociar los complejos nucleoprotéicos. Se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol adicionado, la mezcla se agitó, se incubó a temperatura ambiente 3 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min a 4 °C, lo que dió lugar a tres fases. Se recuperó el RNA presente en la fase superior que corresponde a la fase acuosa e inmediatamente se adicionó 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de trizol, se agitó vigorosamente, se incubó 24 horas a -20°C y se centrifugó a 13, 000 rpm durante 25 min a 4 °C. La mezcla se decantó teniendo cuidado de no eliminar el precipitado y se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, se retiró el etanol por decantación y se volvió a centrifugar 5 min a 13,000 rpm. El precipitado se dejó secar y se diluyó con 18 µl de agua libre de nucleasas. El RNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.5.2 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA utilizando reactivos (la enzima transcriptasa reversa, deoxinucleótidos, los oligonucleótidos y agua libre de nucleasas) y procedimientos (incubación por 2 h a 37 °C) especificados por el fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). El cDNA se diluyó con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 10 ng/µl y se almacenó a 4°C.

6.5.3 qRT-PCR

La PCR en tiempo real se realizó en una mezcla de reacción conteniendo Máxima® SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Auburn, USA), los oligonucleótidos y el cDNA en un volumen final de 10 µl. Los datos de abundancia relativa se analizaron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El nivel de expresión de

nuestro gen de interés se normalizó a la expresión del gen constitutivo que codifica para la hypoxantina-guanina fosforiltransferasa (hpert) para calcular los niveles de mRNA.

Gen	Sentido	Antisentido	T. de alineación °C
HPRT	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2
PRLR	ACACGCGCAGATCTCCTTACCA	CCCCTTCTTGACAGCCACTT	56.2
IL-1 β	GTTGATTCAAGGGGACATTA	AGCTTCAATGAAAGACCTCA	60.2
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	60.2
iNOS	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	60.2
VEGF	CGCGAGTCTGTGTTTTTGCA	CAGAGCGGAGAAAAGCATTGT	53.7
MMP2	CCAGATACCTGCACCACCTT	GTTGAAGGAAAACGAGCGAAG	60.2
MMP3	ATGCTGTCTTTGAAGCATT	GCACTTCCTTTCACAAAGAC	62.1
MMP8	ATTCTTGCTAACCCAGGA	TGTTTTCACTTCAGCCCTTG	57.3

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos

6.6 Ensayo de translocación nuclear de NF-kB

El ensayo de translocación nuclear de NF-kB se realizó de acuerdo con el protocolo establecido (64). Se sembraron 5×10^4 STF en cubreobjetos estériles. Al cabo de 30 minutos se cuantificaron aquellas células que tienen un marcaje nuclear positivo para NF-kB mediante una inmunofluorescencia. Brevemente, las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de PRL (de origen ovino; 100nM (4)) y/o IL-1 β (recombinante; 1ng/mL (62)) durante 30 minutos. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se bloquearon con PBS + 0.05% Tritón X-100 + 1% BSA + 5% NGS durante 1 h a T.A.; entre cada uno de los pasos se realizaron lavados con PBS durante 2 min bajo agitación. Se incubaron por la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-p65 (1:1000) (SC-109, Santa Cruz), se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500) (ab150077, Abcam) durante 2 h a T.A. Por último, se retiró el anticuerpo secundario y las preparaciones se lavaron con PBS, se montaron en un portaobjetos con vectashield y se sellaron con barniz. Las imágenes se digitalizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX51) y se analizaron utilizando el programa ImageJ 1.X (63)

contabilizando el número de células totales vs el número de células con marcaje nuclear positivo para el anticuerpo anti-p65. Los resultados se representaron como porcentaje de células positivas para el marcaje nuclear de NF- κ B con respecto al número de células totales.

6.7 Ensayo de proliferación

El ensayo de proliferación se realizó de acuerdo con el protocolo establecido (65). Se sembraron 10,000 STF en pozos de 0.33 cm². Al cabo de 24 h se cuantificaron aquellas células con DNA recién sintetizado mediante la reacción de click, la cual reconoce mediante una azida fluorescente aquellas células que incorporaron un análoga de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU; Sigma Aldrich) a su DNA. Brevemente, las células se trataron con 10 μ M de EdU durante 24 h en ausencia (control) o presencia de PRL (100nM (4)) y/o IL-1 β (1ng/mL (62)). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 durante 1 h. Entre cada uno de los pasos se realizaron lavados con TBS 1X durante 2 min bajo agitación. La presencia de EdU en el DNA recién sintetizado se detectó mediante su marcaje durante 20 minutos con una azida fluorescente y la reacción de click que consiste en la combinación en fresco de 100 mM Tris, 0.5 mM CuSO₄, 50 mM ácido ascórbico y 20 μ M Azida Fluor 545 (Sigma-Aldrich) seguidos por lavados de 2 y 30 min con 0.5% TritonX-100 - TBS 1X. El DNA se tiñe con 5 μ g/ml de bisBenzimida Hoescht 33342 trihidroxicloruro (Sigma-Aldrich) (66). Las imágenes se digitalizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX51) y se analizaron utilizando el programa ImageJ 1.X (63) contabilizando el número de células totales vs el número de células marcadas con la azida fluorescente. Los resultados se representan como porcentaje de proliferación.

6.8 Análisis estadístico

Las diferencias entre 2 grupos se evaluaron mediante el análisis no paramétrico U-Mann Whitney. Las diferencias entre 3 o más grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc Tukey. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Los cultivos celulares están enriquecidos en sinoviocitos tipo fibroblasto

Determinamos los componentes celulares que conforman el cultivo de STF proveniente de la membrana sinovial de ratón para determinar su pureza. Los cultivos recién aislados fueron incubados durante 7 días para aumentar la densidad celular (P0) y una vez alcanzada el 90% de confluencia, las células se desprendieron y cultivaron consecutivamente tres veces (P3). Comparamos la heterogeneidad celular entre P0 y P3 mediante la evaluación por qPCR de la expresión de la proteína de anclaje CD 90 la cual es un marcador de fibroblastos. No encontramos un aumento significativo en la expresión de CD90 en el P3 (Figura 6) probablemente debido a que en P0 el componente de STF del cultivo ya es muy elevado. Es importante mencionar que los STF representan la mayor proporción (80%) de los sinoviocitos en la capa íntima de la membrana sinovial (28, 67).

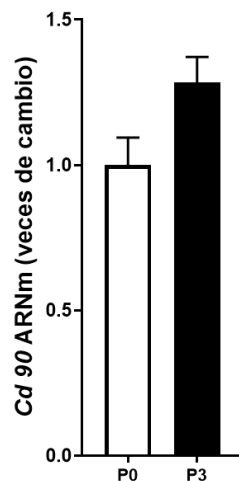


Figura 6. Expresión de marcadores de fibroblastos (CD 90) en cultivos primarios de STF recién aislados (P0) y en el pasaje 3 (P3). El nivel de expresión se determinó por qRT-PCR, se normalizó con respecto al gen constitutivo (hprt) y se expresó con respecto al control (P0). Los resultados muestran la media \pm EE de triplicados de un experimento.

Analizamos por microscopía de campo claro la presencia de diferentes tipos celulares encontrados tanto en P0 como en P3, ya que se ha reportado que en los

primeros pasajes puede haber contaminación principalmente por macrófagos provenientes de la membrana sinovial (62). De manera consistente, en P0 observamos la presencia de macrófagos, los cuales pueden ser fácilmente identificados debido a que presentan proyecciones dispuestas radialmente (flecha; Figura 7) a diferencia de los STF los cuales cuentan con una morfología mayoritariamente bipolar (23, 68). En el pasaje 3 no pudimos observar ninguna célula con la morfología tipo macrófago, lo que apoya que nuestro cultivo está predominantemente conformado por STF.

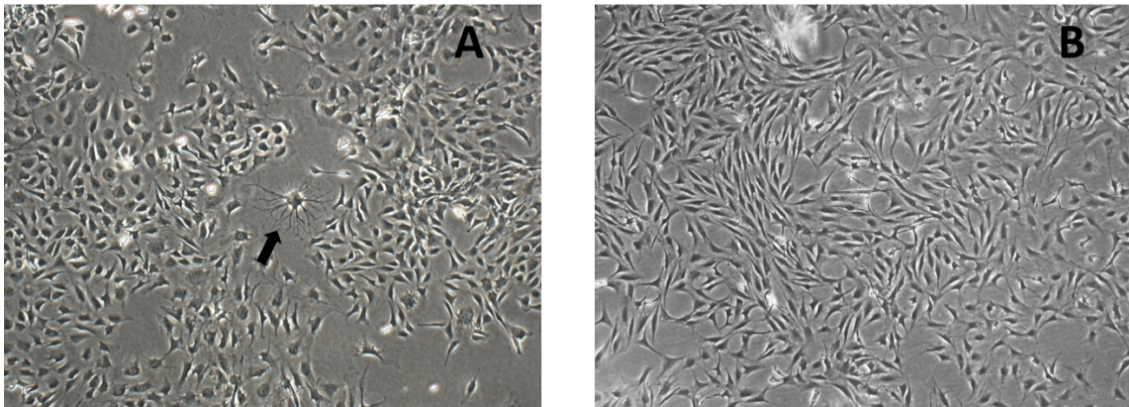


Figura 7. Microfotografías de campo claro de cultivos en pasaje 0 (A) y pasaje 3 (B) provenientes de la membrana sinovial. La flecha muestra la presencia de macrófagos encontrados solo en P0. Magnificación 10x.

Por último, al analizar el cultivo por inmunocitoquímica observamos que en el P3 más del 99 % de las células marcadas para DAPI colocalizaban al marcador específico de fibroblastos (CD 90) (Figura 8) lo cual coincide con lo previamente reportado (4, 61) y nos permite concluir que en el P3 nuestros cultivos son fundamentalmente STF.

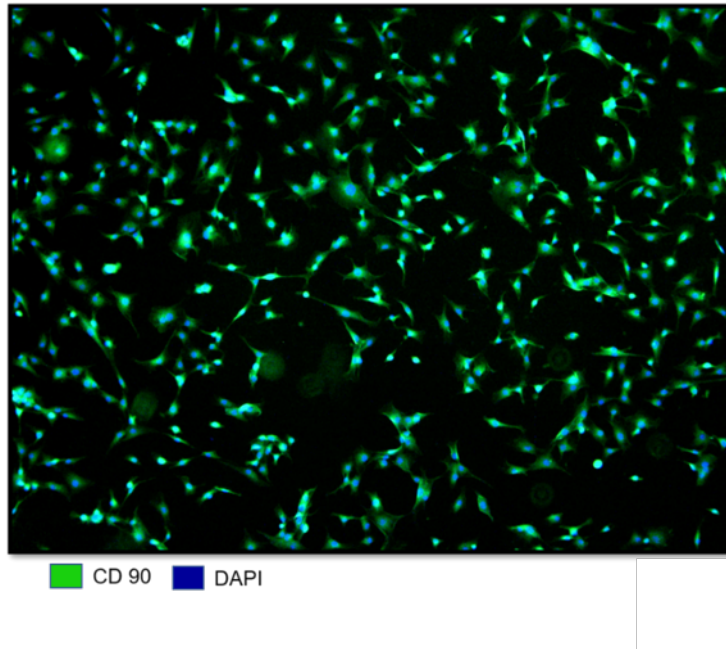


Figura 8. Imagen representativa de cultivos obtenidos de la membrana sinovial en su pasaje 3 (P3) sometidos a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD90 (verde) y el marcador de DNA, DAPI (azul). Magnificación 10x.

7.2 La prolactina reduce el aumento en la actividad metabólica inducida por IL-1 β

Para evaluar las acciones de la PRL sobre la respuesta celular inducida por IL-1 β en STF, realizamos el ensayo de MTT, el cual a través de medir la actividad de enzimas mitocondriales nos indica la actividad metabólica celular. Los STF se incubaron durante 72 hrs con concentraciones crecientes de IL-1 β similares a las reportadas en la literatura (62, 69, 70). Encontramos que 1 ng/ml es la dosis mínima de IL-1 β para estimular la actividad metabólica de los STF (Figura 9). Esta concentración es la que utilizamos para realizar los experimentos subsecuentes.

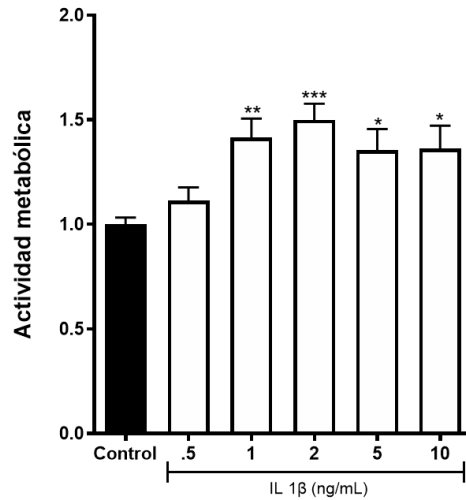


Figura 9. La IL-1 β incrementa la actividad metabólica de los STF en forma dosis-dependiente. La actividad metabólica se determinó por el ensayo de MTT. Los resultados se encuentran normalizados con respecto al control no tratado con IL-1 β y corresponden a la media \pm EE de tres experimentos independientes. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Evaluamos también durante 72 hrs el efecto de dosis crecientes de la PRL sobre la actividad metabólica basal de los STF. Ninguna de las dosis administradas tuvo efecto, lo que nos indica que la PRL no altera la actividad metabólica basal de los STF (Figura 10). Para evaluar acciones de la PRL sobre la expresión de mediadores proinflamatorios en los STF tratados con IL-1 β utilizamos la concentración de PRL de 100 nM que es la empleada en reportes previos que analizan acciones antiinflamatorias de la PRL sobre fibroblastos sinoviales (4).

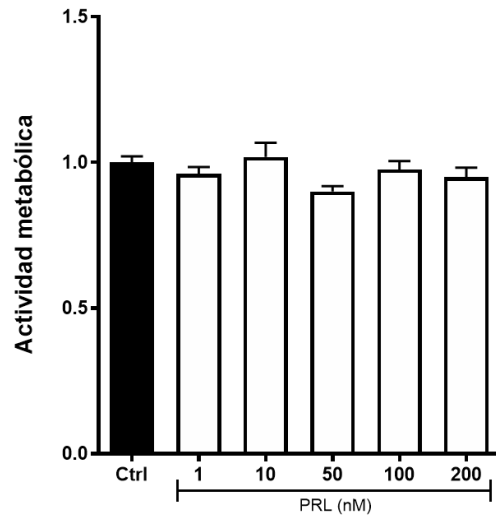


Figura 10. La PRL no modifica la actividad metabólica basal de los STF. La actividad metabólica se determinó por ensayo de MTT. Los resultados se encuentran normalizados con respecto al control no tratado con PRL y corresponden a la media \pm EE de tres experimentos independientes.

Posteriormente determinamos el efecto de la PRL sobre la actividad metabólica de los STF inducida por IL-1 β . Encontramos que la PRL reduce la actividad metabólica de los STF inducida por la IL-1 β de manera significativa (Figura 11), lo que apoya que la PRL ejerce un papel antiinflamatorio en este tipo celular, específicamente contra las acciones de IL-1 β .

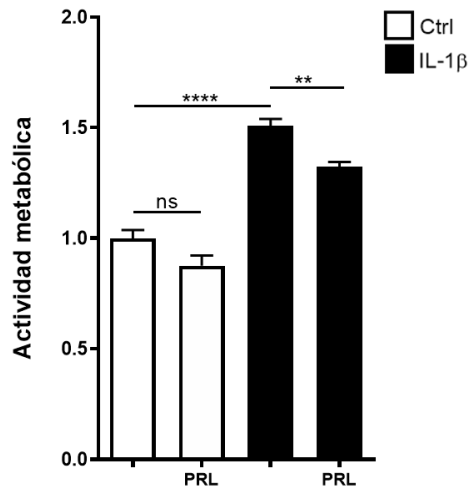


Figura 11. La PRL disminuye el aumento en la actividad metabólica inducida por IL-1β en cultivos de STF. La actividad metabólica se determinó por el ensayo de MTT en un cultivo primario de STF incubados o no con IL-1β (1ng/mL) en ausencia o presencia de PRL (100nM). Los resultados se encuentran normalizados con respecto al control sin tratamiento y corresponden a la media ± EE de tres experimentos independientes. ns: no significativo, **p<0.01, ****p<0.0001.

7.3 La IL-1β aumenta la expresión génica del receptor de prolactina

Dado que una combinación de citocinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α e INF-γ) aumentan la expresión del receptor de PRL en cultivos primarios de STF (4) y que la PRL disminuye el aumento de la actividad metabólica en respuesta a la IL-1β en este tipo celular, nos propusimos evaluar si el tratamiento exclusivo con IL-1β (1ng/mL) también modifica la expresión del receptor de PRL. Encontramos que basta la IL-1β para estimular la expresión del receptor de la PRL en los STF (Figura 12), lo que apoya la relación funcional de esta hormona con dicha citocina en este tipo celular.

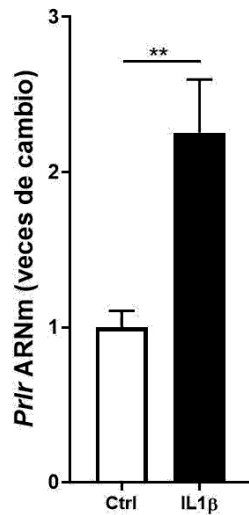


Figura 12. La IL-1 β induce la expresión del receptor de PRL en STF. Cuantificación por qRT-PCR de los niveles de ARNm del receptor de PRL (Prlr) en STF incubados o no con IL-1 β (1ng/ml). Los resultados se encuentran normalizados con respecto al control sin tratamiento y corresponden a la media \pm EE de tres experimentos independientes. **p<0.01.

7.4 La prolactina reduce el aumento en la expresión génica de IL-1 β , IL-6 e iNOS inducidas por IL-1 β .

Una vez evaluada la expresión del receptor de PRL bajo un tratamiento con IL-1 β nos preguntamos si la PRL tendría algún efecto modulando la expresión de mediadores proinflamatorios en respuesta a dicha citocina. Encontramos que la IL-1 β aumenta su propia expresión (Figura 13A), así como la expresión de otros mediadores proinflamatorios (IL-6 e iNOS) (Figura 13B y C) y angiogénicos (VEGF) (Figura 13D). Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura sobre la expresión de estos genes por IL-1 β en los STF (33, 71).

La PRL antagonizó el efecto de la IL-1 β sobre la expresión de IL-1 β , IL-6 e iNOS (Figura 13A, B y C), pero no disminuyó la del VEGF (Figura 13D), por lo que podemos concluir que la PRL está actuando sobre los STF como un factor antiinflamatorio. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ledesma y colaboradores, donde la PRL inhibe la expresión de algunas de estas citocinas en STF activados por la combinación de IL-1 β , TNF α e INF γ (4). Nuestros resultados sugieren que la inhibición por PRL pudiera ser específica contra la IL-1 β .

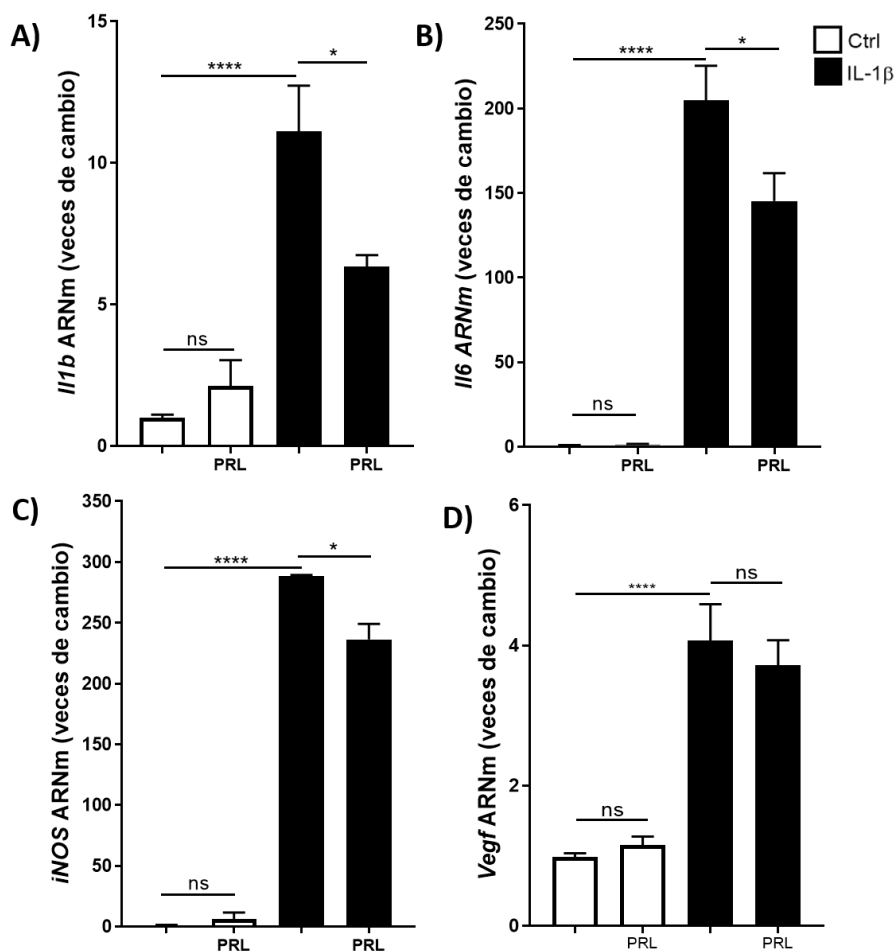


Figura 13. La PRL disminuye la expresión estimulada de IL-1 β , IL-6 e iNOS inducida por IL-1 β en STF. Cuantificación por qRT-PCR de los niveles de ARNm de Il1b (A), Il6 (B), iNOS (C) y de vegf (D) en STF incubados o no con IL-1 β (1ng/ml) en ausencia o presencia de PRL (100 nM). El nivel de expresión se determinó por qRT-PCR, se normalizó con respecto al gen constitutivo (hprt) y se expresó con respecto al control no tratado. Los resultados corresponden a la media \pm EE de triplicados de tres experimentos independientes. ns: no significativo, * p <0.05, **** p <0.0001.

7.5 La prolactina no modifica la expresión génica de metaloproteasas de matriz inducidas por IL-1 β .

La IL-1 β también estimula en los STF la producción de MMP (6), que son enzimas implicadas en los procesos de degradación de la matriz extracelular y pieza clave en la destrucción de la articulación en la AR. La expresión de las MMP-2, -3 y -8 (Figura 14A, B y C) se elevó por el tratamiento con IL-1 β , sin embargo, la PRL no modificó dicho efecto.

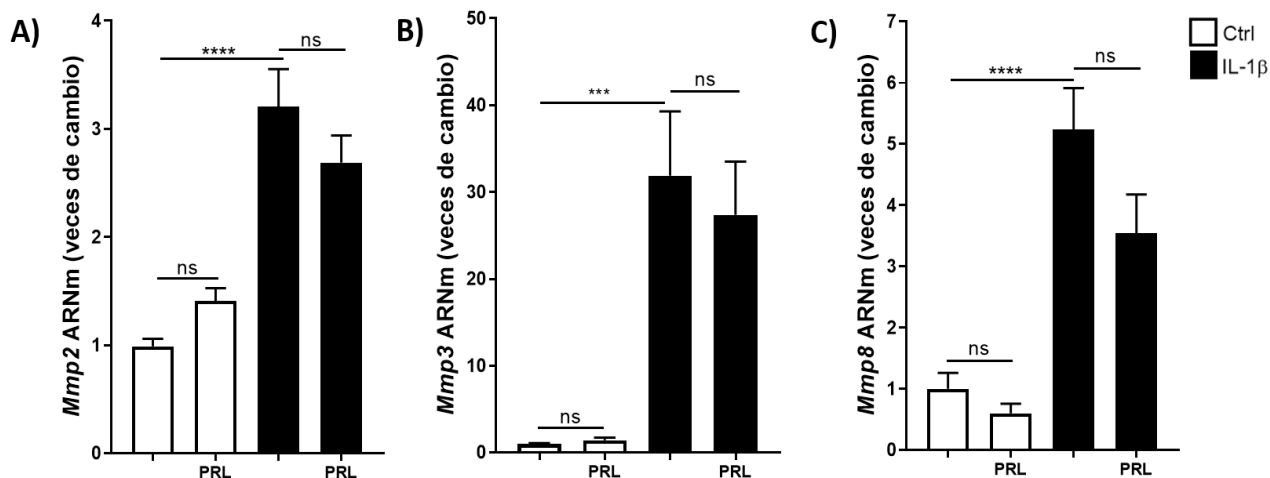


Figura 14. La PRL no disminuye el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la expresi3n de las metaloproteasas de matriz inducidas en STF. Cuantificaci3n por qRT-PCR de los niveles de ARNm de *Mmp2* (A), *Mmp3* (B) y *Mmp8* (C) en STF incubados o no con IL 1 β (1ng/ml) en ausencia o presencia de PRL (100 nM). El nivel de expresi3n se determin3 por qRT-PCR, se normaliz3 con respecto al gen constitutivo (*hprt*) y se expres3 con respecto al control no tratado. Los resultados corresponden a la media \pm EE de triplicados de tres experimentos independientes. ns: no significativo, *** p <0.001, **** p <0.0001.

7.6 La prolactina reduce la translocaci3n nuclear de NF- κ B inducida por IL-1 β

El NF- κ B es un factor de transcripci3n involucrado en una gran cantidad de procesos inflamatorios. Bajo condiciones basales se encuentra en el citoplasma de las c3lulas unido a una familia de prote3nas inhibitoras que previenen su translocaci3n y por ende su actividad como factor de transcripci3n (64). Como ya ha sido reportado anteriormente, algunas citocinas proinflamatorias como la IL-1 β o el TNF α propician la translocaci3n nuclear de NF- κ B generando as3 un ambiente inflamatorio (64, 72, 73).

De manera consistente con el efecto inhibitorio de la PRL sobre acciones proinflamatorias de la IL-1 β en los STF, esta hormona disminuy3 la activaci3n de NF- κ B en respuesta a IL-1 β medida a trav3s de su translocaci3n nuclear (Figura 15 A, B). Este resultado apoya el que la PRL act3a a trav3s de bloquear la activaci3n de NF- κ B por IL-1 β .

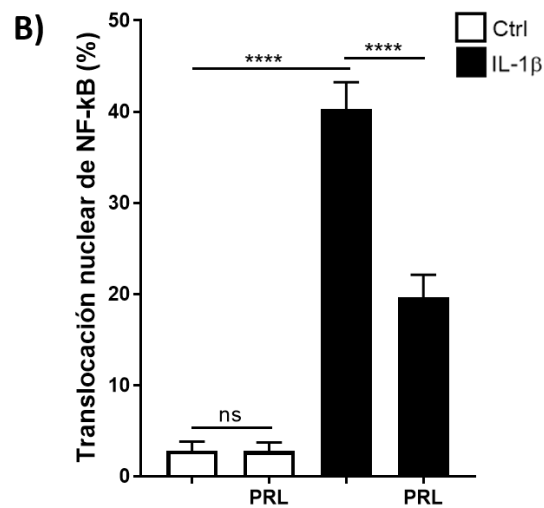
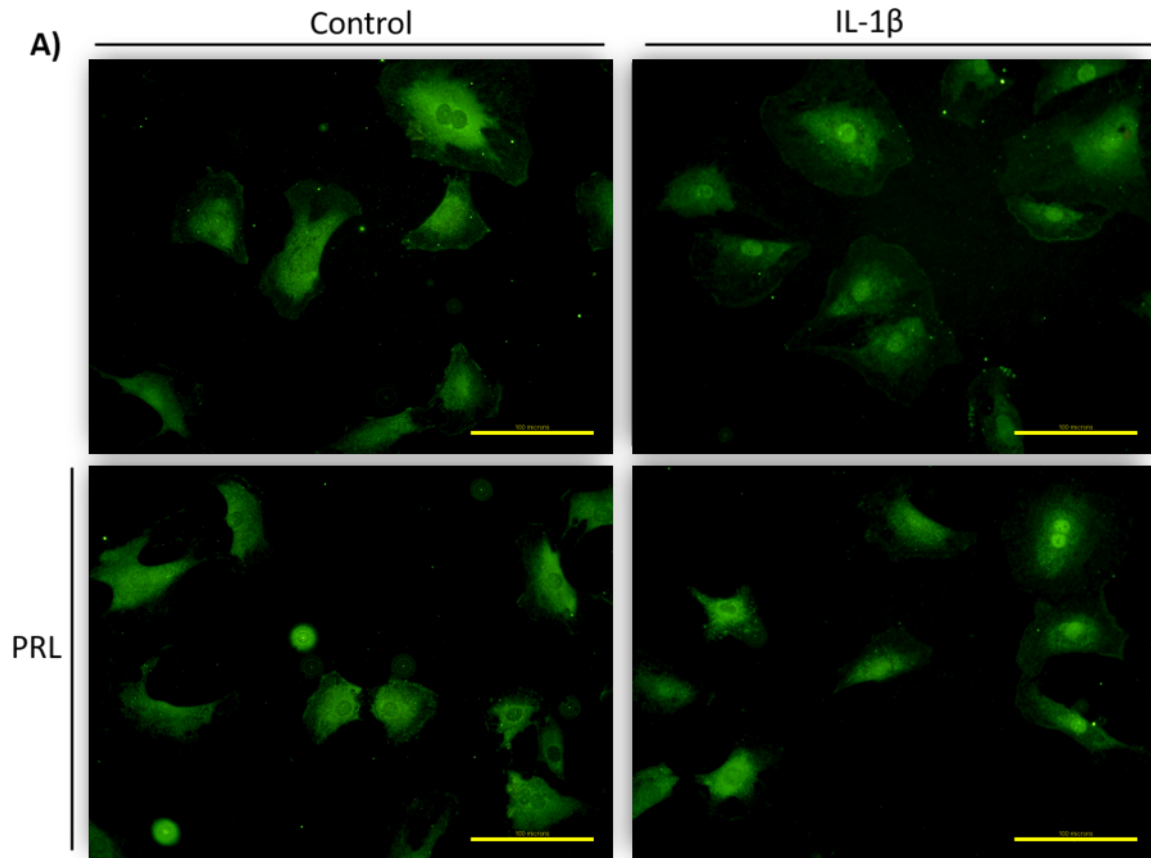


Figura 15. La PRL disminuye la translocación nuclear de NF-kB inducida por la IL-1 β en STF. Campos representativos de STF marcados con anticuerpo contra la subunidad p65 de NF-kB. Barra de calibración = 100 μ m (A). La grafica muestra el porcentaje de núcleos positivos para la traslocación nuclear de NF-kB (B). Las células fueron incubadas o no con IL-1 β (1ng/ml) en ausencia o presencia de PRL (100 nM). Los resultados corresponden a la media \pm EE de un experimento independiente. ns: no significativo, ****p<0.0001.

7.7 La IL-1 β reduce la proliferación de los sinoviocitos tipo fibroblasto y este efecto no se ve modificado por la prolactina.

La actividad metabólica puede utilizarse como una medida indirecta para evaluar la proliferación celular (74) y existe evidencia que indica que la IL-1 β estimula la proliferación de STF aislados de la articulación de pacientes con AR (41). Dados nuestros resultados con el ensayo de MTT, investigamos si la proliferación de los STF aumenta bajo el tratamiento con IL-1 β . Sorpresivamente, encontramos que esta citocina no solo no aumenta sino reduce marcadamente la proliferación de los STF (Figura 16B). Por lo tanto, podemos concluir que la IL-1 β inhibe la proliferación de STF obtenidos de la articulación de ratones sanos y cultivados bajo las condiciones de nuestro experimento y, por ende, que la actividad metabólica de los STF en estas condiciones no se asocia directamente con su proliferación. Además, el tratamiento con PRL no modificó la proliferación de los STF en ausencia o en presencia de la IL-1 β (Figura 16B).

En su conjunto, nuestros resultados muestran que la PRL disminuye el efecto de la IL-1 β sobre la actividad metabólica y la expresión de mediadores proinflamatorios, pero no modifica la proliferación de los STF de ratón en cultivo primario.

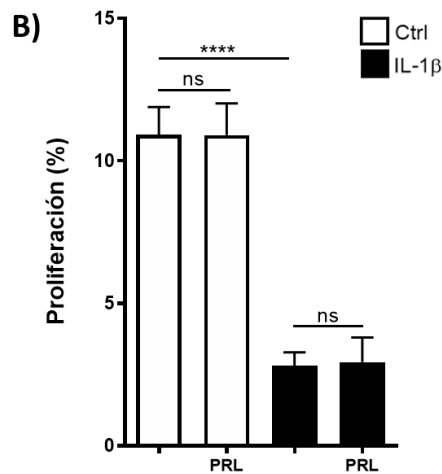
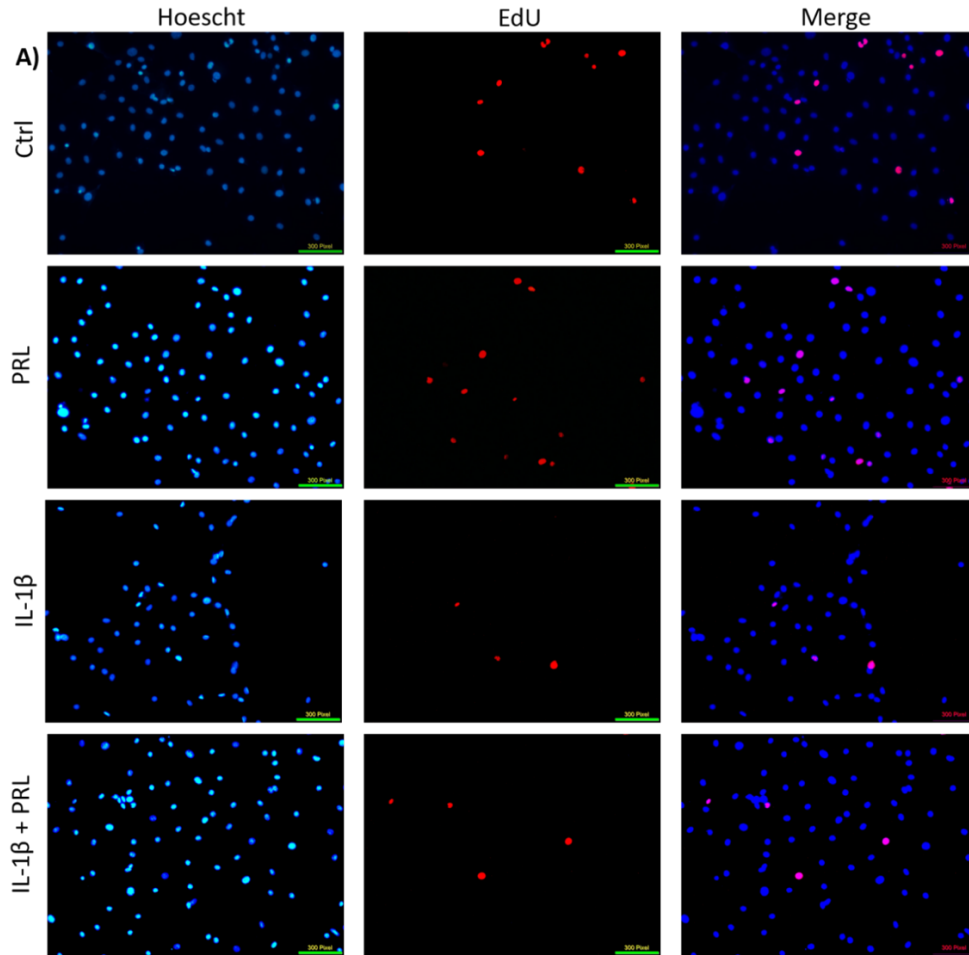


Figura 16. La IL-1 β reduce la proliferación de los STF y este efecto no se modifica por la PRL. Campos representativos de STF marcados mediante tinción para núcleos (Hoescht), síntesis de DNA (EdU) y el empalme (merge) de ambas reacciones. Barra de calibración = 100 μ m (A). La grafica muestra el porcentaje de proliferación (B). Las células fueron incubadas o no con IL 1 β (1ng/ml) en ausencia o presencia de PRL (100 nM). Los resultados corresponden a la media \pm EE de triplicados de tres experimentos independientes. ns: no significativo, ****p<0.0001.

8. Discusión

La pérdida de la homeostasis articular en patologías como la AR conlleva a la alteración de los componentes de la misma (3, 7, 75, 76), lo cual propicia el desarrollo de un frente inflamatorio que afecta a la membrana sinovial (31, 67) al cartilago (10) y al hueso (4) (23, 67). Los STF desempeñan un papel protagónico en el inicio y progresión de los procesos inflamatorios de la AR ya que responden y secretan mediadores inflamatorios que promueven su proliferación y características invasivas (23, 31).

Bajo condiciones normales, los STF se encuentran en la membrana sinovial en estado quiescente formando una capa de 2 a 3 células de grosor (23, 67) y no es hasta que ocurre un desbalance en el ambiente articular, como por ejemplo un proceso inflamatorio, cuando se induce en ellos la activación de genes que codifican para la expresión de factores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y enzimas como la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y MMPs que conllevan a su proliferación, migración y supervivencia (23, 24, 31, 35, 77).

La activación de los STF obedece esencialmente a la acción de citocinas proinflamatorias producidas sistémicamente, o por células inmunes infiltradas en la articulación, entre las que sobresale la IL-1 β , una citocina clave en la AR (78). La IL-1 β puede actuar sola o en combinación con otras citocinas como el TNF α , la IL-6 y el INF γ activando a los STF que junto con macrófagos residentes y leucocitos infiltrados forman un frente inflamatorio o pannus que degrada al cartilago y al hueso (4, 10, 23). De hecho, la IL-1 β también se produce por los STF donde de manera autocrina potencia la acción de citocinas como el TNF- α y la IL-6 (23).

En este trabajo mostramos que la IL-1 β , de forma indirecta, puede también regular de manera negativa el proceso inflamatorio a través de favorecer la expresión del receptor de la PRL y por ende las acciones antiinflamatorias de la hormona. Así, la IL-1 β estimula la expresión génica del PRLR en cultivos primarios de STF y la PRL

reduce el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la actividad metabólica de los STF y la expresión de mediadores proinflamatorios.

El predominio en las hembras y la influencia del embarazo y la lactancia han asociado durante muchos años a la PRL con la patogénesis de la AR (54, 55, 57). La PRL es una hormona sexualmente dimórfica que aumenta durante el embarazo y la lactancia, se eleva en la circulación de algunos pacientes con AR y tiene acciones sobre células inmunes y tejidos de la articulación que afectan la progresión del padecimiento (9). Estudios clínicos han reportado tanto acciones inflamatorias como antiinflamatorias de la PRL que parecen depender de los niveles circulantes de la hormona, de su síntesis en tejidos de la articulación, y de interacciones complejas en el microambiente inflamatorio (9). Por ejemplo, se conoce que una combinación de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e INF γ) frecuente en la articulación inflamada estimula la expresión del receptor de la PRL (4) y que la PRL reduce la inflamación articular, la formación del *pannus*, la destrucción del cartílago y la pérdida de hueso en el modelo de AR inducido por adyuvante completo de Freund (4, 10).

El antagonismo funcional entre la PRL y la IL-1 β observado en este estudio se sustenta en la obtención de cultivos altamente enriquecidos (\cong 99%) y homogéneos de STF obtenidos de acuerdo con el método previamente reportado (61, 62). Se partió de preparaciones aisladas de la articulación de la rodilla de ratones conteniendo proporciones variables de STF, macrófagos, células endoteliales y adipocitos (62, 79). Los adipocitos se eliminaron durante la centrifugación del paquete celular debido a su baja densidad. Por su parte, las células endoteliales requieren de condiciones especiales para su supervivencia y proliferación como es la adición de factores de crecimiento y no sobrevivieron en las condiciones del cultivo (80). Los sinoviocitos tipo macrófagos constituyen la mayor fuente de contaminación debido a que se cultivan bajo las mismas condiciones que los STF (81). No obstante, este tipo celular tiene muy baja tasa proliferativa y una muy alta adherencia (68, 82), por lo que el uso repetido de tripsinizaciones breves y de al menos tres pasajes nos permitió eliminar su

presencia en los cultivos. La pureza de los cultivos se corroboró morfológicamente a través de la presencia de células con un fenotipo claro de tipo fibroblasto (68) que se marcaron positivamente con anticuerpos dirigidos contra CD90, un marcador específico de fibroblasto. Nuestros resultados coinciden con lo esperado con el método utilizado (62).

La adquisición y mantenimiento del fenotipo invasivo de los STF requiere del aumento en la actividad metabólica celular (31), que comúnmente se mide a través de evaluar la actividad de enzimas mitocondriales a través del ensayo colorimétrico MTT (83, 84). De acuerdo con lo esperado, la IL-1 β estimuló la actividad metabólica de los STF a las concentraciones comúnmente utilizadas en experimentos similares (41). La mayor actividad metabólica probablemente resulta del aumento en la expresión de factores inflamatorios y vasoactivos. Observamos que la IL-1 β estimula marcadamente la expresión de los ARN mensajeros de la propia IL-1 β , la IL-6, la iNOS, las MMP -2, -3, -8 y del factor de crecimiento vascular (VEGF). Sin embargo, de manera sorprendente, la IL-1 β no solo no incrementó la proliferación de los STF, sino que la disminuyó de manera marcada. Este efecto es inesperado ya que se conoce que la IL-1 β es un mitógeno para STF obtenidos de las membranas sinoviales de pacientes con AR (23, 43, 78). Hasta donde sabemos el efecto de la IL-1 β no se ha analizado sobre STF de tejidos sanos murinos, lo que sugiere que la resultante de su acción mitogénica depende de factores adicionales asociados a la condición artrítica. Estudios subsecuentes deberán analizar esta posibilidad.

En apoyo a que la acción de la IL-1 β sobre los STF puede ser regulada por PRL (4, 85), encontramos que la IL-1 β estimula la expresión del receptor de la PRL en estas células. Este resultado coincide con lo previamente reportado por Ledesma y colaboradores, donde observaron que un tratamiento combinado de IL-1 β , TNF- α e INF- γ incrementa la expresión del receptor de la PRL en cultivos primarios de STF (4). Nuestros hallazgos indican que la IL-1 β es parcialmente responsable de esta acción y nos llevaron a evaluar su posible implicación funcional. Encontramos que la PRL por sí sola no modifica la actividad de los STF, a juzgar por la ausencia

de cambios en la tasa metabólica, la expresión de mediadores inflamatorios y la proliferación. Sin embargo, la PRL redujo significativamente el efecto de la IL-1 β sobre estos parámetros a excepción de la proliferación. El efecto de la PRL reduciendo el aumento en la actividad metabólica inducido por la IL-1 β es consistente con su acción inhibitoria sobre la expresión de IL-1 β , IL-6 e iNOS, sin embargo, la PRL no modificó la expresión de las MMP ni de VEGF en respuesta a la IL-1 β . Si bien en nuestro sistema la PRL no modificó la expresión de este factor proangiogénico, se ha reportado que un fragmento proteico derivado del corte de la PRL conocido como vasoinhibina si disminuye su expresión en un modelo de artritis inducida por adyuvante (86), por lo que la influencia de fragmentos de PRL toma también gran importancia en la modulación de mediadores involucrados en el desarrollo de la AR.

El efecto inhibitorio de la PRL contra la acción proinflamatoria de la IL-1 β apoya resultados previos obtenidos en articulaciones completas donde el tratamiento con PRL redujo el aumento en la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF α e INF γ observado en articulaciones artríticas en el modelo de artritis inflamatoria inducido por adyuvante en la rata (4). Asimismo, nuestros hallazgos también son consistentes con el efecto reportado de la PRL inhibiendo el aumento en la expresión de IL-1 β e IL-6 o de iNOS inducido por la combinación de IL-1 β , TNF- α e INF- γ en cultivos primarios de STF de la articulación de ratones sanos (4) o de fibroblastos de pulmón (87), respectivamente. Todos estos estudios apoyan el que los STF son células blanco de las acciones antiinflamatorias de la PRL en la artritis. Sin embargo, esta es la primera vez que se observa el antagonismo funcional exclusivamente contra la IL-1 β en estas células.

Es indudable la complejidad del ambiente inflamatorio en la articulación artrítica donde interaccionan varias citocinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios. Sin embargo, el diseño e implementación de posibles tratamientos requiere de la exploración del grado de participación de cada una de ellas en la patogenia y progresión de las enfermedades artríticas. Estudios sobre los efectos de terapias anti IL-1 β han encontrado que una deficiencia de esta citocina disminuye la

inflamación articular, infiltración celular al sinovio, así como el daño al cartílago y al hueso (78, 88, 89). La IL-6 también desempeña un papel importante en la patogénesis de la AR (90-94) y se induce por citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α (91). Se conoce que, en modelos de artritis, una deficiencia de IL-6 genera resistencia para el desarrollo de la enfermedad (95) inhibiendo la proliferación sinovial, formación de *pannus*, infiltración de células inmunes, angiogénesis y la destrucción del hueso y cartílago (96). El aumento en la producción de óxido nítrico también es protagónico en los procesos inflamatorios de la articulación (97, 98), siendo los STF una de las principales fuentes de producción de iNOS en el sinovio (99, 100). Terapias que reducen la producción de óxido nítrico a través de inhibir su síntesis han disminuido la inflamación articular en modelos de artritis (101).

El diseccionar la acción de la PRL contra la IL-1 β permite ahondar en los mecanismos específicos de sus efectos antiinflamatorios. Por ejemplo, se conoce que la IL-1 β induce la expresión de mediadores proinflamatorios, moléculas de adhesión y enzimas que degradan la matriz extracelular (102, 103) a través de activar las vías de señalización de las MAPK y NF- κ B (104, 105). NF- κ B es un factor de transcripción que bajo condiciones normales se encuentra inactivo en el citoplasma debido a su interacción con una familia de proteínas citoplásmicas, denominadas inhibidores de kappa B (I κ B), que impiden la translocación de NF- κ B al núcleo. La IL-1 β estimula la fosforilación de las I κ B lo cual conlleva a su degradación y, por ende, a la translocación nuclear de NF- κ B. Una vez en el núcleo, el NF- κ B se une a secuencias en el DNA promotoras de genes que codifican factores inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, MMP) (36, 73, 106). En este estudio, presentamos evidencias de que la PRL podría estar antagonizando la acción de la IL-1 β sobre los STF a través de bloquear la vía de NF- κ B. Encontramos que el tratamiento con PRL disminuye la traslocación nuclear de NF- κ B inducida por IL-1 β . Queda por determinar el efecto de la PRL sobre la fosforilación/degradación de las I κ B y cuál sería la vía activada por PRL que interacciona con la vía de NF- κ B para producir este efecto.

La utilización de modelos de estudio in vitro como lo son los STF, nos permite discernir de manera más fina la participación de estas células en los procesos inflamatorios, sin embargo deja de lado la interacción que estas células puedan tener con los demás componentes articulares, por lo que complementar los estudios con diferentes aproximaciones experimentales ayudaría a complementar el entendimiento de su participación en un contexto más fisiopatológico.

En resumen, este trabajo apoya a los STF como blanco celular de los efectos antiinflamatorios de la PRL e introduce el antagonismo funcional directo de esta hormona contra las acciones inflamatorias de la IL-1 β .

9. Conclusiones

1. Se obtuvieron cultivos primarios altamente enriquecidos en STF.
2. La IL-1 β actúa sobre los STF incrementando su actividad metabólica, la expresión de mediadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6 e iNOS) y de las MMP-2, -3, y -8 e incrementando la translocación nuclear de NF-kB, pero reduciendo su proliferación.
3. La IL-1 β aumenta la expresión del receptor de PRL.
4. La PRL reduce el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la actividad metabólica, la expresión de mediadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6 e iNOS) y la translocación nuclear de NF-kB de los STF, pero no altera la expresión de metaloproteasas ni la proliferación celular.
5. Los STF son blanco celular de los efectos antiinflamatorios de la PRL a través de un antagonismo funcional directo contra las acciones inflamatorias de la IL-1 β .

10. Bibliografías

1. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):229.
2. Mendoza-Vázquez G, Rocha-Muñoz AD, de Jesús Guerra-Soto A, Ramírez-Villafaña M, González-Sánchez AG, Gámez-Nava JI, et al. Artritis reumatoide y dislipidemias. *El residente*. 2013;8(1):12-22.
3. Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, McInnes I. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):280-309.
4. Ledesma-Colunga MG, Adan N, Ortiz G, Solis-Gutierrez M, Lopez-Barrera F, Martinez de la Escalera G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):93.
5. Stojanovic S, Bojana S, Stoimenov TJ, Nedovic J, Zivkovic V, Despotovic M, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha (G-308A) genetic variant with matrix metalloproteinase-9 activity and joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(7):1479-85.
6. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529-43.
7. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. 2012;39(3):222-8.
8. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2002;41(7):793-800.
9. 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*. 2016;73(15):2929-48.

10. Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG, Perales-Canales SI, Quintanar-Stephano A, Lopez-Barrera F, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3902-13.
11. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51 Suppl 5:v3-11.
12. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2018;36(2):175-84.
13. Hu Y, Sparks JA, Malspeis S, Costenbader KH, Hu FB, Karlson EW, et al. Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(8):1357-64.
14. Lorenzo D, GianVincenzo Z, Carlo Luca R, Karan G, Jorge V, Roberto M, et al. Oral-Gut Microbiota and Arthritis: Is There an Evidence-Based Axis? *Journal of clinical medicine*. 2019;8(10).
15. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2205-19.
16. Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:54-64.
17. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(5):732-5.
18. Goronzy JJ, Weyand CM. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):249.
19. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9664):659-72.
20. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on

specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(11):3433-8.

21. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone research*. 2018;6:15.

22. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(1):38-46.

23. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233(1):233-55.

24. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(6):223.

25. Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev*. 2008;223:7-19.

26. Ainola MM, Mandelin JA, Liljestrom MP, Li TF, Hukkanen MV, Konttinen YT. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. *Clinical and experimental rheumatology*. 2005;23(5):644-50.

27. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S81-90.

28. Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K. Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis and rheumatism*. 1981;24(6):835-43.

29. Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol*. 2013;6(3):111-25.

30. Asif Amin M, Fox DA, Ruth JH. Synovial cellular and molecular markers in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):385-93.

31. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):110.
32. Han Z, Boyle DL, Shi Y, Green DR, Firestein GS. Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(6):1088-92.
33. Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis research*. 2000;2(5):356-60.
34. Szekanecz Z, Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in rheumatoid arthritis. Potential targets for pharmacological intervention. *Drugs Aging*. 1998;12(5):377-90.
35. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(11):1781-90.
36. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.
37. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and cartilage*. 2012;20(12):1484-99.
38. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52(12):870-5.
39. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(9):1263-7.
40. Ulfgren AK, Grondal L, Lindblad S, Khademi M, Johnell O, Klareskog L, et al. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Annals of the rheumatic diseases*. 2000;59(6):439-47.

41. Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S, et al. An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*. 2001;50(2):65-72.
42. Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology*. 1989;66(2):196-200.
43. Lou L, Liu Y, Zhou J, Wei Y, Deng J, Dong B, et al. Chlorogenic acid and luteolin synergistically inhibit the proliferation of interleukin-1beta-induced fibroblast-like synoviocytes through regulating the activation of NF-kappaB and JAK/STAT-signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(6):499-507.
44. Zhu L, Zhu L. Sophocarpine suppress inflammatory response in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw*. 2017;28(3):120-6.
45. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews*. 2008;29(1):1-41.
46. Adan N, Ledesma-Colunga MG, Reyes-Lopez AL, Martinez de la Escalera G, Clapp C. Arthritis and prolactin: a phylogenetic viewpoint. *General and comparative endocrinology*. 2014;203:132-6.
47. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1523-631.
48. Manzon LA. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General and comparative endocrinology*. 2002;125(2):291-310.
49. Sakane T, Suzuki N. Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2000;48(5):417-27.
50. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current opinion in immunology*. 1998;10(3):271-8.
51. Kelly PA, Binart N, Freemark M, Lucas B, Goffin V, Bouchard B. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochemical Society transactions*. 2001;29(Pt 2):48-52.

52. Neidhart M, Gay RE, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(5-6):218-22.
53. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 2007;78 Suppl 1:255-61.
54. de Man YA, Dolhain RJ, van de Geijn FE, Willemsen SP, Hazes JM. Disease activity of rheumatoid arthritis during pregnancy: results from a nationwide prospective study. *Arthritis and rheumatism.* 2008;59(9):1241-8.
55. Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman A. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2000;43(5):1010-5.
56. Tang MW, Garcia S, Gerlag DM, Tak PP, Reedquist KA. Insight into the Endocrine System and the Immune System: A Review of the Inflammatory Role of Prolactin in Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis. *Frontiers in immunology.* 2017;8:720.
57. 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 and rheumatism.* 2004;50(11):3458-67.
58. Costanza M, Binart N, Steinman L, Pedotti R. Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. *Autoimmun Rev.* 2015;14(3):223-30.
59. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Current directions in autoimmunity.* 2010;11:180-210.
60. Davis JM, 3rd, Matteson EL. Cytokine biomarkers and the promise of personalized therapy in rheumatoid arthritis. *Reumatologia clinica.* 2009;5(4):143-6.
61. Zhao J, Ouyang Q, Hu Z, Huang Q, Wu J, Wang R, et al. A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts. *Biomed Rep.* 2016;5(2):171-5.
62. Hardy RS, Hülso C, Liu Y, Gasparini SJ, Fong-Yee C, Tu J, et al. Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation. *Arthritis research & therapy.* 2013;15(1):R24.

63. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
64. Trask OJ, Jr. Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
65. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2415-20.
66. Chazotte B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(1):pdb prot5557.
67. Smith MD. The normal synovium. *The open rheumatology journal*. 2011;5:100-6.
68. Seidel MF, Koch FW, Vetter H. Macrophage-like synoviocytes display phenotypic polymorphisms in a serum-free tissue-culture medium. *Rheumatology international*. 2006;26(3):244-51.
69. You S, Yoo SA, Choi S, Kim JY, Park SJ, Ji JD, et al. Identification of key regulators for the migration and invasion of rheumatoid synoviocytes through a systems approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):550-5.
70. Li G, Liu D, Guo S, Sunagawa M, Hisamitsu T, Liu Y. Anti-invasive effects of *Celastrus Orbiculatus* extract on interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha combination-stimulated fibroblast-like synoviocytes. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14:62-.
71. Nadiv O, Beer Y, Goldberg M, Agar G, Loos M, Katz Y. Decreased induction of IL-1beta in fibroblast-like synoviocytes: a possible regulatory mechanism maintaining joint homeostasis. *Mol Immunol*. 2007;44(12):3147-54.
72. Macotela Y, Mendoza C, Corbacho AM, Cosio G, Eiserich JP, Zentella A, et al. 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *The Journal of endocrinology*. 2002;175(3):R13-8.
73. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2.

74. Boulton RA, Hodgson HJ. Assessing cell proliferation: a methodological review. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88(2):119-30.
75. van den Berg WB, van Lent PL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI. Amplifying elements of arthritis and joint destruction. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66 Suppl 3:iii45-8.
76. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9746):1094-108.
77. Huber LC, Distler O, Tarnier I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006;45(6):669-75.
78. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43 Suppl 3:iii2-iii9.
79. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture--primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis research*. 2001;3(1):72-6.
80. van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nature protocols*. 2008;3(6):1085-91.
81. Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2005;290:91-103.
82. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods in molecular medicine*. 2007;135:365-75.
83. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
84. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*. 2018;2018(6).

85. Wu X, Liu Y, Guo X, Zhou W, Wang L, Shi J, et al. Prolactin inhibits the progression of intervertebral disc degeneration through inactivation of the NF- κ B pathway in rats. *Cell death & disease*. 2018;9(2):98.
86. Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, Garcia-Rodrigo JF, Adan N, Martinez de la Escalera G, et al. Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2020.
87. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, et al. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*. 2003;544(1-3):171-5.
88. van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 1999;17(6 Suppl 18):S105-14.
89. van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van De Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Annals of the rheumatic diseases*. 1999;58 Suppl 1:I40-8.
90. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2011;2011:765624.
91. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(2):585-92.
92. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Mihara M. Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule. *Rheumatology international*. 2010;30(3):309-15.
93. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Current opinion in pharmacology*. 2004;4(4):386-91.

94. Hashizume M, Hayakawa N, Suzuki M, Mihara M. IL-6/sIL-6R transsignalling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatology international*. 2009;29(12):1449-54.
95. Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R, Serlupi-Crescenzi O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine*. 1999;11(12):1057-64.
96. Mihara M, Kotoh M, Nishimoto N, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, et al. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2001;98(3):319-26.
97. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 1992;51(11):1219-22.
98. Nagy G, Koncz A, Talarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzas E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(3):210.
99. Grabowski PS, Wright PK, Van 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *British journal of rheumatology*. 1997;36(6):651-5.
100. Dey P, Panga V, Raghunathan S. A Cytokine Signalling Network for the Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Rheumatoid Arthritis. *PLoS one*. 2016;11(9):e0161306.
101. Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, et al. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *European journal of pharmacology*. 1995;273(1-2):15-24.
102. Tolboom TC, Pieterman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(11):975-80.

103. Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1999;58(11):691-7.
104. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(3):207-14.
105. Mengshol JA, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(1):13-20.
106. Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP. Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. 2000;12(10):1469-79.

11. Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología de la artritis reumatoide.

Figura 2. Histología sagital de la articulación femoro-tibial de ratón control vs ratón artrítico teñido con hematoxilina eosina.

Figura 3. Histología sinovial humana de pacientes sanos vs pacientes artríticos teñido con hematoxilina eosina.

Figura 4. Vía de señalización intracelular de IL-1 β .

Figura 5. Vía de señalización de PRL.

Figura 6. Expresión de marcadores de fibroblastos (CD 90) en cultivos primarios de STF recién aislados (P0) y en el pasaje 3 (P3).

Figura 7. Microfotografías de campo claro de cultivos en pasaje 0 y pasaje 3 provenientes de la membrana sinovial. Magnificación 10x.

Figura 8. Imagen representativa de cultivos obtenidos de la membrana sinovial en su pasaje 3 (P3) sometidos a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD90 (verde) y el marcador de DNA, DAPI (azul).

Figura 9. La IL-1 β incrementa la actividad metabólica de los STF en forma dosis-dependiente.

Figura 10. La PRL no modifica la actividad metabólica basal de los STF.

Figura 11. La PRL disminuye el aumento en la actividad metabólica inducida por IL-1 β en cultivos de STF.

Figura 12. La IL-1 β induce la expresión del receptor de PRL en STF.

Figura 13. La PRL disminuye la expresión estimulada de IL-1 β , IL-6 e iNOS inducida por IL-1 β en STF.

Figura 14. La PRL no disminuye el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la expresión de las metaloproteasas de matriz inducidas en STF.

Figura 15. La PRL disminuye la translocación nuclear de NF- κ B inducida por la IL-1 β en STF.

Figura 16. La IL-1 β reduce la proliferación de los STF y este efecto no se modifica por la PRL.

12. *Índice de tablas*

Tabla 1. Moléculas efectoras producidas por STF.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos.