



MUNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN Y EFECTOS DUALES DE LA VASOINHIBINA EN
LA ARTRITIS INFLAMATORIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. MARÍA GEORGINA ORTIZ ARBALLO

TUTOR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QUERÉTARO. DICIEMBRE DE 2022



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. El trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM (proyectos IN200518 e IN202321). La alumna recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 278266 y del PAPIIT IN202321.

JURADO DE EXAMEN

Integrantes:

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Dra. María de Carmen Clapp Jiménez Labora

Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Articulación sinovial: función y estructura	3
2.1.1 Membrana sinovial	4
2.2 Artritis Reumatoide	6
2.2.1 Patogénesis	7
2.2.1.1 Implicación de los sinoviocitos tipo fibroblasto en la AR	8
2.2.1.2 Implicación de los vasos sanguíneos en la AR	11
2.2.2 Erosión ósea	13
2.2.3 Degradación del cartílago	13
2.3 Prolactina	14
2.3.1 Efectos sobre componentes de la articulación	15
2.3.2 Efectos sobre la inflamación	16
2.4 Vasoinhibina	16
2.4.1 Efectos sobre los vasos sanguíneos	17
2.4.2 Efectos sobre la inflamación	18
2.5 Implicación del eje PRL/Vasoinhibina en la AR	19
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 HIPÓTESIS	22
5 OBJETIVOS	22
6 MATERIALES Y MÉTODOS	23

6.3 MATERIALES	23
6.3.1 Reactivos	23
6.3.2 Animales	23
6.4 MÉTODOS	23
6.4.1 Modelo de artritis inducida por antígeno (AIA)	23
6.4.2 Inyección intraarticular de citocinas	24
6.4.3 Sobreexpresión de la vasoinhibina mediante el vector viral AAV2-Vi en AIA	24
6.4.4 Análisis histopatológico de la articulación	24
6.4.4.1 Evaluación del pannus y la densidad celular	24
6.4.4.2 Inmunohistoquímica de células inmunes	25
6.4.4.3 Determinación del área del hueso y la densidad de osteoclastos	25
6.4.5 Evaluación de la vasculatura del pannus	26
6.4.5.1 Inmunohistoquímica para vasos sanguíneos	26
6.4.5.2 Ensayo de azul de Evans	26
6.4.6 Generación de vasoinhibina bajo condiciones de inflamación	27
6.4.6.1 Inmunoprecipitación de vasoinhibina en suero	27
6.4.6.2 Corte de PRL con lisado articular	28
6.4.7 Aislamiento y cultivo de sinoviocitos tipo fibroblasto (STF)	28
6.4.8 Determinación de la vía de señalización	29
6.4.8.1 Producción de óxido nítrico	29
6.4.8.1 Traslocación nuclear de NF κ B	29
6.4.8.2 Western Blot	29
6.4.9 Análisis de la expresión de mediadores inflamatorios	30
6.4.9.1 Extracción de RNA	30
6.4.9.2 Síntesis de cDNA	30
6.4.9.3 qPCR	31
6.4.10 Análisis estadístico	31

7 RESULTADOS.....	33
7.1 La terapia génica con vasoinhibina tiene efectos opuestos en función de la gravedad de la artritis inducida por antígeno (AIA)	33
7.2 Efectos antiinflamatorios de la vasoinhibina en el modelo grave de artritis inducida por antígeno (AIA grave)	36
7.2.1 La terapia génica con vasoinhibina reduce el pannus y la pérdida de hueso en el modelo grave de AIA	36
6	
7.2.2 La terapia génica con vasoinhibina reduce la expresión de marcadores vasculares en el pannus de ratones con AIA grave	40
7.2.3 La terapia génica con vasoinhibina reduce la densidad vascular en el pannus de ratones con AIA grave	422
7.2.4 La vasoinhibina reduce la permeabilidad vascular en la membrana sinovial de ratones con AIA grave	44
7.2.5 La terapia génica con vasoinhibina bloquea la fosforilación de eNOS en la Ser1179 inducida en la AIA grave.....	46
7.3 Efectos proinflamatorios de la vasoinhibina en el modelo leve de artritis inducida por antígeno (AIA leve)	47
7.3.1 La terapia génica con vasoinhibina incrementó el pannus y la infiltración de células inmunes en el modelo de AIA leve	47
7.3.2 La terapia génica con vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en el modelo de AIA leve	49
7.3.3 La vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblasto	52
7.3.4 La vasoinhibina induce la expresión de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en los STF mediante la activación de NF- κ B	54
7.4 Generación de vasoinhibina.....	58
7.4.1 La vasoinhibina circulante se incrementa bajo condiciones de inflamación.....	58
7.4.2 El corte de PRL a vasoinhibina se incrementa en la articulación artrítica por acción de las metaloproteasas de matriz y la catepsina D.	60
8 DISCUSIÓN	63

9 CONCLUSIÓN	71
10 REFERENCIAS	72
11 ÍNDICE DE FIGURAS	83
12 ÍNDICE DE TABLAS	85
13 ANEXOS	86
13.1 Congresos.....	86
13.2 Publicaciones.....	88
13.3 Artículos de investigación derivados de esta tesis.....	89

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mis estudios en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (matrícula 523003291) con sede en el Instituto de Neurobiología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de becario 278266).

Al apoyo y tutoría incondicional de mi tutora principal la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L, así como de los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Martha Legorreta Herrera y el Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez.

A la guía proporcionada por el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

A la asistencia brindada por la Dra. Nuri Aranda López y Carmen Mendoza López de la Unidad de Enseñanza y Posgrado y a Ramón Martínez Olvera y Omar Hernández del Apoyo Académico de Cómputo del Instituto de Neurobiología.

Al apoyo del MVZ José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla y Dra. María A. Carbajo, responsables del Bioterio del Instituto de neurobiología.

Al apoyo técnico y valiosa ayuda de la Dra. Xarubet Ruiz Herrera y del Nut. Fernando López Barrera.

A la labor de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

A mis compañeros de laboratorio José Fernando García Rodrigo, Guadalupe Ledezma Colunga y Oscar Fernando Martínez Díaz por su invaluable apoyo en el desarrollo de mi proyecto.

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado por el PAPIIT proyectos IN200518 e IN202321.

A mi familia y amigos:

Gracias por su apoyo incondicional

“Lo máspreciado que posee el hombre es la vida. Se le otorga una sola vez y hay que vivirla de forma que no se sienta un torturante dolor por los años pasados en vano, para que no quemela vergüenza por el ayer vil y mezquino. Y hay que apresurarse a vivir. Pues una enfermedad tonta o cualquier casualidad trágica pueden cortar el hilo de la existencia”.

Nicolái Ostrovski

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artritis reumatoide
PRL	Prolactina
Vi	Vasoinhibina
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
NF-κB	Factor nuclear kappa B
IκB	Inhibidor de kappa B
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IFN-γ	Interferon- γ
MMP	Metaloproteasas de matriz
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
STM	Sinoviocitos tipo macrófago
STF	Sinoviocitos tipo fibroblasto
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
HIF-1	Factor de transcripción inducible por hipoxia 1
CCL	Ligando de la quimiocina con motivo CC
CXCL	Ligando de la quimiocina con motivo CXC
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente
JAK2	Cinasa de tirosina Janus - 2
STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1

uPA	Activador del plasminógeno de la uroquinasa
uPAR	Receptor del activador del plasminógeno de la uroquinasa
AIA	Artritis inducida por antígeno
mBSA	Albúmina de suero bovino metilada
CFA	Adyuvante completo de Freund
AAV2	Virus adenoasociados tipo 2

RESUMEN

Las artropatías inflamatorias, incluida la artritis reumatoide (AR), son afectadas por hormonas reproductivas. La hormona prolactina (PRL) se ha asociado tanto con el mejoramiento como con el empeoramiento de la AR. Estos efectos opuestos pueden involucrar la conversión proteolítica de la PRL a vasoinhibina, un fragmento de la hormona que inhibe la angiogénesis y la vasopermeabilidad, pero que también puede promover la inflamación. En esta tesis investigamos los efectos duales de la vasoinhibina utilizando virus adenoasociados recombinantes que la codifican (AAV2-Vi) y el modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) en el ratón. Propusimos que un grado grave o leve de inflamación articular, inducido mediante dosis altas o bajas de antígeno (albúmina bovina metilada), podrían propiciar la manifestación de acciones antiinflamatorias o proinflamatorias de la vasoinhibina, respectivamente. Consistentemente, encontramos que bajo la AIA grave, la inyección intraarticular de los AAV2-Vi aminora la inflamación articular, la formación del pannus y la erosión ósea a través de inhibir la angiogénesis y la vasopermeabilidad sinovial a través del bloqueo de la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular. En contraposición, bajo la AIA leve, los AAV2-Vi promueven la inflamación articular, la infiltración leucocitaria y la expresión de mediadores proinflamatorios y quimiocinas a través de efectos directos sobre los fibroblastos sinoviales promotores de la activación de la vía del factor de transcripción NF κ B. Por último, encontramos que los niveles de vasoinhibina aumentan en la circulación de ratones con AIA y que esta elevación puede tener lugar en tejidos de la articulación por acción de las metaloproteasas de matriz y la catepsina D. Se concluye que la vasoinhibina se genera durante la artritis inflamatoria donde ejerce acciones duales sobre la inflamación que son función del grado de inflamación y su blanco celular. Proponemos que la vasoinhibina actúa en los fibroblastos sinoviales y en las células endoteliales para inicialmente promover y posteriormente inhibir la inflamación, respectivamente. Estos efectos opuestos permiten explicar los efectos duales de la PRL en la AR y proporcionan nuevos conocimientos para entender la fisiopatología de las artritis inflamatorias y el desarrollo de nuevos tratamientos.

ABSTRACT

Inflammatory arthropathies defines a family of diseases, including rheumatoid arthritis (RA), influenced by reproductive hormones. The hormone prolactin (PRL) has been associated with both positive and negative outcomes in RA. These opposite effects may involve its proteolytic conversion to vasoinhibin, a PRL fragment that inhibits angiogenesis and vasopermeability but that also promotes inflammation. Here, we investigated the dual actions of vasoinhibin on joint inflammation using an adeno-associated virus type-2 vector encoding vasoinhibin (AAV2-Vi) and the mouse model of antigen-induced arthritis (AIA) under severe (high-antigen) and mild (low-antigen) conditions. We reasoned that severe and mild AIA, induced by high and low levels of antigen (bovine methylated albumin), could favor the anti-inflammatory and pro-inflammatory effects of vasoinhibin, respectively. Consistent with this hypothesis, the intraarticular delivery of AAV2-Vi in severe AIA reduced joint inflammation, pannus hyperplasia, and bone erosion via the blockage of the vascular endothelial growth factor-induced eNOS activation that leads to pannus angiogenesis and vasopermeability. In contrast, under mild AIA, AAV2-Vi reduced joint swelling and enhanced leukocyte infiltration and expression of proinflammatory mediators and chemokines via a direct action on synovial fibroblasts that activate NF- κ B signaling. Finally, we found the upregulation of vasoinhibin levels in the circulation of AIA mice that could take place in joint tissues by the action of matrix metalloproteases and cathepsin D. We suggest that vasoinhibin is generated during inflammatory arthritis and acts on synovial fibroblasts and endothelial cells to initially promote and later inhibit inflammation, respectively. These opposite effects explain the dual effect of PRL on disease and provide new insights for understanding the pathophysiology of RA and the development of new treatments.

1. INTRODUCCIÓN

Las artropatías inflamatorias comprenden un grupo de enfermedades crónico-degenerativas que afectan principalmente las articulaciones (Adan et al., 2014). Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la artritis reumatoide (AR), un padecimiento autoinmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. En la AR la infiltración de células inmunes y la hiperplasia de la membrana sinovial generan un frente inflamatorio e invasivo conocido como pannus que conduce a la destrucción del cartílago y del hueso subyacente (Ollier et al., 2001).

El pannus secreta citocinas proinflamatorias que incluyen al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-1 β (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6) que incrementan la inflamación y, aunado a la condición hipóxica del tejido, promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). A su vez, la angiogénesis estimula la formación del pannus a través de favorecer la infiltración de células inmunes y la supervivencia celular (Szekanecz et al., 2009). Por lo tanto, es claro que el estudio de factores capaces de contrarrestar la inflamación y la angiogénesis tienen un potencial valor terapéutico en la AR. Entre estos factores se encuentra la hormona prolactina (PRL) y, su metabolito, la vasoinhibina, un fragmento de la PRL con efecto antiangiogénico.

Estudios de nuestro laboratorio (Adan et al., 2013; Ledesma-Colunga et al., 2017), mostraron que la PRL reduce la inflamación y la destrucción del cartílago y del hueso de la articulación en modelos de artritis inflamatoria en ratas y ratones. Se encontró que el tratamiento con PRL disminuye la formación del pannus, la expresión de citocinas proinflamatorias, la apoptosis de los condrocitos, la activación de osteoclastos, la inflamación y el dolor de la articulación. Estos resultados mostraron un evidente valor protector de la PRL contra la artritis inflamatoria y sugieren su posible relevancia terapéutica en la AR. Sin embargo, el papel de la PRL en la AR no es claro. La PRL se ha asociado tanto de forma negativa como positiva con la AR y se propone que esto puede depender de las concentraciones de la hormona y su interacción con el ambiente inflamatorio. Por ejemplo, el incremento de proteasas como metaloproteasas de matriz (MMP) en la artritis podría promover el procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibina, un fragmento de la PRL que inhibe la angiogénesis pero promueve la inflamación.

La vasoinhibina comprende una familia de fragmentos de la PRL que van de los 5.6 a los 18 kDa dependiendo del sitio de corte de la hormona por proteasas que incluyen las MMPs (Macotela et al., 2006),

la catepsina D (Piwnica et al., 2004), la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (Ge et al., 2007), la trombina (Zamora et al., 2021) y la plasmina (Friedrich et al., 2021). La vaso inhibina reconocida por su efecto inhibidor de la angiogénesis, permeabilidad y dilatación vascular, podría regular negativamente la inflamación y la formación del pannus en la artritis (C. Clapp, Aranda, et al., 2006).

Sin embargo, también se ha reportado que la vaso inhibina puede promover la inflamación a través de estimular la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) en fibroblastos de pulmón que son células importantes en la mediación de reacciones inflamatorias de las vías respiratorias (Corbacho et al., 2000). Además, la vaso inhibina induce la expresión de quimiocinas en el endotelio vascular promoviendo la infiltración de células inmunes en tumores de melanoma (Tabruyn et al., 2007). En este sentido, los posibles efectos opuestos de la vaso inhibina sobre la inflamación de la articulación podrían contribuir a explicar los hallazgos controversiales de la PRL en la AR.

En la presente tesis demostramos que la vaso inhibina se genera en un modelo de artritis inducida por antígeno, la cual, en función del grado de inflamación y del blanco celular, tiene un efecto pro- o antiinflamatorio. Así, en un modelo de artritis grave, la vaso inhibina reduce la inflamación articular a través de inhibir la angiogénesis y vasopermeabilidad del pannus mediante bloquear el efecto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). En contraste, en el modelo de artritis leve la vaso inhibina presenta un efecto proinflamatorio mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B en los fibroblastos sinoviales. Nuestros resultados ofrecen una nueva perspectiva para entender el controvertido papel fisiológico y fisiopatológico de la PRL en la AR y sugieren posibles abordajes terapéuticos basados en elevar los niveles tanto de la PRL como de su metabolito la vaso inhibina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Articulación sinovial: función y estructura

Las articulaciones permiten la unión y movilidad del sistema músculo esquelético. La clasificación funcional de las articulaciones se basa en el grado de movimiento que permiten, por lo que pueden ser sinartrosis (inmóviles), anfiartrosis (poco móviles) o diartrosis (movimiento libre) (Tortora et al., 2002). Desde un punto de vista estructural, la clasificación de las articulaciones está basada en la presencia o la ausencia de una cavidad sinovial y en el tipo de tejido conjuntivo que las conforma, clasificándose en fibrosas, cartilaginosas o sinoviales. Las articulaciones fibrosas se encuentran unidas por tejido conjuntivo denso irregular (p. ej. entre los huesos del cráneo), mientras que las cartilaginosas se mantienen unidas como su propio nombre lo indica, por cartílago (p. ej. sínfisis del pubis). Las articulaciones sinoviales contienen un espacio entre los huesos denominada cavidad sinovial que permite su movimiento, por lo que todas las articulaciones sinoviales son del tipo diartrosis. Los huesos que forman parte de este tipo de articulaciones se encuentran cubiertos por una capa de cartílago hialino que sirve para reducir el rozamiento óseo durante el movimiento y ayuda amortiguar los golpes (Figura 1A).

La cavidad sinovial está rodeada por una cápsula articular. La cápsula articular está compuesta por dos capas, una membrana fibrosa externa y una membrana sinovial interna. Por un lado, la membrana fibrosa consta de tejido conjuntivo fundamentalmente de colágena que se une al periostio de los huesos y su función está dada por sus características de flexibilidad y fuerza de tensión lo cual permite el movimiento de la articulación y evita que los huesos se luxen, respectivamente. La membrana sinovial tapiza la cara interna de la cápsula articular y su función principal es la síntesis del líquido sinovial el cual a su vez ayuda a lubricar y nutrir el cartílago avascular (Figura 2) (Gary S Firestein et al., 2016).

A continuación, describiremos más a detalle los componentes de la membrana sinovial debido al papel tan importante que tiene en la fisiopatología de la AR.

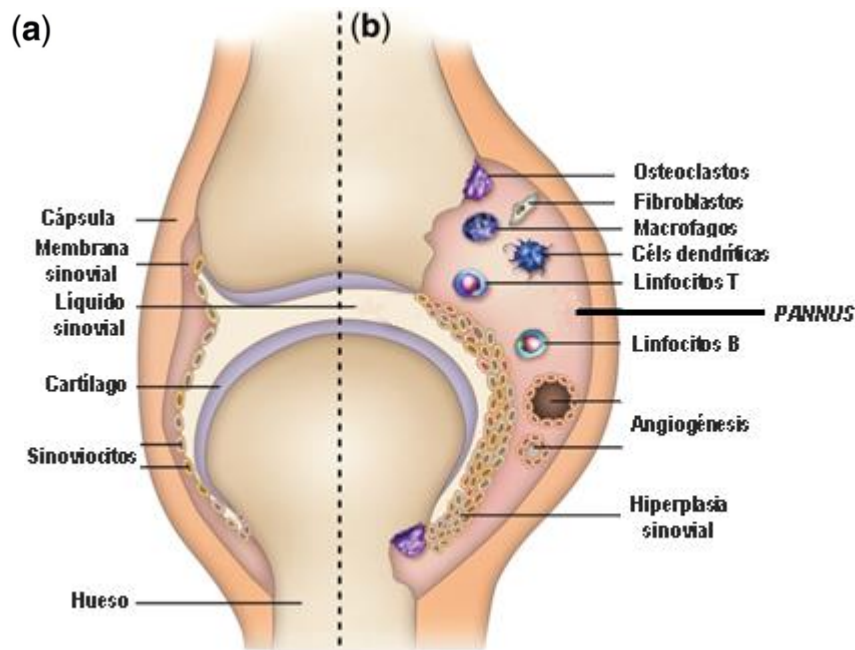


Figura 1. Vista esquemática de una articulación normal(a) y una articulación afectada por AR (b). La articulación afectada muestra un incremento en la inflamación mediada por la infiltración de células del sistema inmune y la hiperplasia de la membrana sinovial (*pannus*) (Modificado de Choy E. 2012)

2.1.1. Membrana sinovial

La membrana sinovial tapiza por dentro la cápsula articular, está en contacto con el líquido sinovial y está constituida por dos capas: (a) la íntima, en contacto con la cavidad articular y conformada por células sinoviales tanto fagocíticas (del tipo macrófago) como secretoras de componentes del líquido sinovial (tipo fibroblasto), y (b) la subíntima, conocida también como estroma que presenta baja celularidad y está constituida principalmente por tejido fibrovascular y adipocitos (Figura 2) (Smith y Wechalekar, 2015).

(a) La capa íntima está formada por una a tres capas de células de revestimiento sinovial denominados sinoviocitos. Los sinoviocitos se dividen en dos poblaciones, los sinoviocitos tipo A o tipo macrófago (STM) y los sinoviocitos tipo B o tipo fibroblasto (STF). Una característica particular es que carece de células epiteliales, membrana basal, uniones estrechas o desmosomas. En su lugar, es una asociación de células en un lecho de matriz extracelular intercalada con fibrillas de colágena tipo I y III y otras proteínas de la

matriz. Además, su organización porosa permite la difusión de los nutrientes del suero al cartílago, tejido avascular y aneural. Esta arquitectura contribuye probablemente a la acumulación de complejos inmunitarios, paredes celulares bacterianas y otros materiales extraños en la articulación (Gary S Firestein et al., 2016).

La distribución de los dos tipos de sinoviocitos en la capa íntima no es homogénea. Diversos estudios en diferentes especies incluyendo el humano, indican que los STM representan el 20% mientras que los STF el 80% de los sinoviocitos (Castor, 1960; Okada et al., 1981). Los STM se generan a partir de los monocitos que se infiltran por los vasos de la capa subíntima, y contienen un gran número de filipodios que les permite fagocitar y eliminar residuos de la cavidad articular. A su vez, los STF se derivan durante el desarrollo del tejido mesenquimal y contienen un retículo endoplasmático rugoso prominente derivado de su función de sintetizar lubricantes esenciales de la articulación como el ácido hialurónico y la lubricina, además de otros componentes importantes de la matriz extracelular como la fibronectina, laminina, colágenas, catabolina, "proteína de la zona superficial", proteinasas neutras, colagenasas y gelatinasas (Hui et al., 2012; Saraiva, 2021).

(b) La capa subíntima está compuesta principalmente por tejido conjuntivo laxo (o areolar) y contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos. Aunque el número de células es bajo en esta capa, las principales que se pueden encontrar son los fibroblastos y adipocitos y en menor medida células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos B y células presentadoras de antígeno. Las fibras elásticas de la subíntima proporcionan la flexibilidad y resistencia a la tensión de esta estructura, mientras que los vasos sanguíneos y linfáticos proveen de nutrientes al cartílago avascular y de células de la respuesta inmune al tejido articular para permitir su mantenimiento y protección, respectivamente (Gary S Firestein et al., 2016; Smith y Wechalekar, 2015).

Bajo condiciones de inflamación, como la AR, la estructura y composición de ambas capas de la membrana sinovial se ven alteradas. Por un lado, las células endoteliales de los vasos en la capa subíntima proliferan formando una extensa red de capilares que promueven el mantenimiento y el crecimiento del tejido inflamado; y por el otro lado, el incremento en la proliferación y la adquisición de un fenotipo proinflamatorio de los STF en la capa íntima, contribuyen al desarrollo de la hiperplasia sinovial o pannus que promueve la destrucción del hueso y cartílago (Bartok y Firestein, 2010; E. M. Paleolog, 2002a).

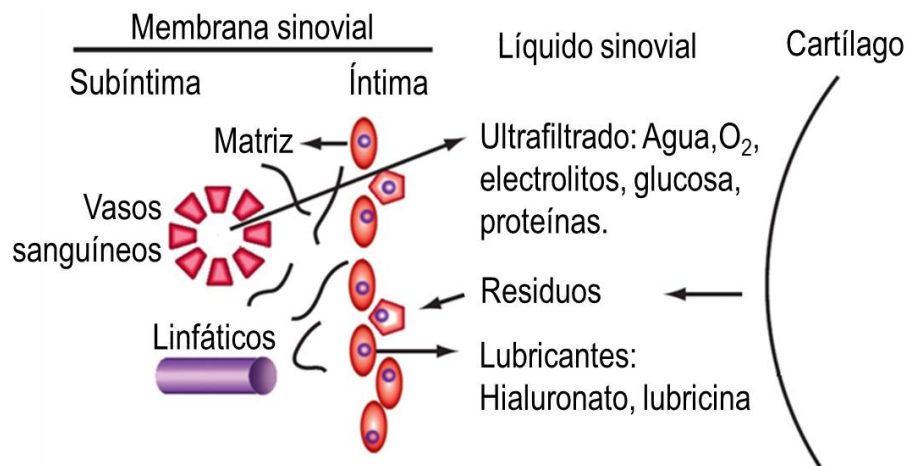


Figura 2. Representación esquemática de la membrana sinovial y la síntesis del líquido sinovial. El líquido sinovial es un ultrafiltrado del plasma que extravasa a través de las fenestraciones de los vasos sanguíneos de la capa subíntima de la membrana sinovial. A su vez, los STF y STM sintetizan lubricantes y eliminan los residuos del líquido sinovial (p. ej. desechos del metabolismo del cartílago), respectivamente (Modificado de Firestein 2016).

2.2. Artritis Reumatoide

Las articulaciones sinoviales o móviles se encuentran constituidas por los extremos de los huesos revestidos por cartílago, están unidas por ligamentos, y contenidas en una cápsula tapizada por la membrana sinovial y lubricada por el líquido sinovial (Figura 1a) (Bartok y Firestein, 2010). En condiciones normales su función es proporcionar una superficie resistente y elástica que permita una amplia gama de movimientos. Sin embargo, esta capacidad de movimiento se pierde bajo condiciones de inflamación articular (artritis inflamatoria), causando dolor y rigidez (Kahlenberg y Fox, 2011).

Existen más de 100 tipos de artritis inflamatorias, y cabe destacar que son la principal causa de pérdida de movimiento y discapacidad en el mundo (Adan et al., 2014). Una de las formas más comunes es la AR, una enfermedad inflamatoria de origen autoinmune con una prevalencia mundial del 1 al 2%, que afecta principalmente a las mujeres (75%) (Whitacre et al., 1999).

La edad de inicio de la AR es variable, y va desde la niñez hasta los adultos mayores de más de 90 años, pero la edad de inicio más común es de los 40 a los 50 años. En una proporción de pacientes con AR, además de los cambios articulares característicos, se presenta inflamación sistémica y manifestaciones extraarticulares, como anemia, vasculitis, nódulos en los tejidos subcutáneos, pulmonares y escleróticos, e inflamación intersticial en los pulmones y el corazón (Ewa M. Paleolog, 2009). Es importante destacar que la AR se asocia a un aumento de la mortalidad derivado del incremento en el riesgo de afecciones cardiovasculares (Kaplan, 2006).

2.2.1. Patogénesis

En general, se considera que las interacciones entre los factores genéticos, las hormonas sexuales y, posiblemente, agentes infecciosos y ambientales participan en el inicio del mecanismo autoinmune en la AR. Por ejemplo, en el 8% de los pacientes los síntomas comienzan a los pocos días de un acontecimiento de un evento específico, como una enfermedad infecciosa derivado de un mimetismo molecular (Harris Jr, 1992). Por otro lado, diversas evidencias han mostrado que mutaciones en genes que producen proteínas que regulan la respuesta inmune son el principal factor de riesgo involucrado en la AR. Entre los genes más importantes involucrados en la susceptibilidad a la AR están los antígenos leucocitarios humanos (HLA), proteínas que se encuentran en células del sistema inmune que permiten el reconocimiento entre lo propio y lo extraño. La presencia de alelos con un motivo de aminoácidos en común (QKRAA), conocida como epítipo compartido en el HLA DRB1, incrementan el riesgo de padecer la enfermedad pues se ha demostrado que reconocen proteínas citrulinadas presentes en la articulación como la fibrina y vimentina (Bax et al., 2011; G. S. Firestein y McInnes, 2017). Por último, se ha observado que factores ambientales como el tabaquismo promueven el desarrollo y severidad de la enfermedad a través de producir estrés oxidativo, inflamación, formación de autoanticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos y cambios epigenéticos (K. Chang et al., 2014).

En la AR, la autoinmunidad mediada por los factores antes mencionados, seguida de la infiltración de leucocitos y la hiperplasia de la membrana sinovial conllevan al desarrollo del pannus que destruye el cartílago y el hueso (Figura 1b) (Adan et al., 2013). La producción local de citocinas proinflamatorias es crucial para iniciar el proceso de inflamación y destruir el tejido articular (Iain B. McInnes y Schett, 2007). Entre estas citocinas proinflamatorias el TNF- α , la IL-1 β , IL-6 y el IFN- γ estimulan la muerte celular y la

degradación de la matriz extracelular del cartílago y del hueso (Adan et al., 2013; Schuerwegh et al., 2003), y su inhibición mejora el deterioro articular (Christodoulou y Choy, 2006).

2.2.1.1. Implicación de los sinoviocitos tipo fibroblasto en la AR

La patogénesis de la AR es compleja e incluye la participación de muchos tipos celulares entre ellos las células del sistema inmune como son los macrófagos, linfocitos T y B. Sin embargo, células residentes de la membrana sinovial como STF tienen un papel relevante debido a que producen citocinas proinflamatorias que promueven la perpetuación de la inflamación y la producción de proteasas que destruyen el cartílago (Bartok y Firestein, 2010).

Los STF muestran características de fibroblasto como la expresión de las colagenasas IV y V, vimentina y CD90 (G. S. Firestein, 1996). Sin embargo, también difieren del resto de los fibroblastos por la expresión de cadherina 11, una molécula de adhesión que permite la agregación de estas células y cuya ausencia en un modelo murino evita la formación de la capa íntima, y con ello, el desarrollo de un modelo de artritis experimental (D. M. Lee, 2007). Los STF también expresan la molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1), integrinas como la $\alpha 4\beta 1$ y receptores de integrinas como la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) que median la migración transendotelial de las células inmunes (Morales-Ducret et al., 1992).

El tejido sinovial en la AR pasa de ser una estructura quiescente relativamente acelular (su grosor es de 1 a 3 capas celulares) a ser un tejido hiperplásico e invasivo (10-20 capas celulares de STF y STM). Aunque los estudios varían considerablemente, muchos sugieren que los STM predominan en la AR pero esto es debido a la migración de nuevas células desde la médula ósea a través de la circulación (Gary S Firestein et al., 2012). En la AR, los STM presentan un fenotipo altamente activado que promueve la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento los cuales activan a los STF permitiendo que éstos a su vez produzcan sus propios mediadores proinflamatorios, principalmente IL1, IL6 y MMPs. Este proceso establece una comunicación paracrina/autocrina que perpetúa la inflamación en el tejido sinovial, recluta nuevas células del sistema inmune a la articulación y contribuye a la degradación de la matriz extracelular (Bartok y Firestein, 2010). La hiperplasia sinovial en adición a las células inmunes infiltradas forma el pannus que se comporta localmente como un tumor invasivo que degrada el cartílago y

erosiona el hueso derivado de la presencia de macrófagos, osteoclastos y los STF que adquieren características invasivas en la condición artrítica.

La participación de cada una de las células que conforman el pannus en la fisiopatología de la enfermedad es un tema que se ha estudiado extensamente. Por un lado, se conoce que el incremento en la maduración y actividad de los osteoclastos (macrófagos del hueso) promueven la erosión del hueso. A su vez, múltiples estudios en modelos experimentales demuestran que los STF son la principal causa de la destrucción del cartílago derivado de sus propiedades invasivas y la producción incrementada de proteasas (Ospelt et al., 2008).

La evidencia más importante acerca de la implicación de los STF en la destrucción del cartílago fue realizada en un modelo murino de inmunodeficiencia combinada (SCID). Los STF fueron co-implantados con cartílago humano bajo la cápsula renal del ratón SCID observando que, los STF provenientes de un paciente con AR, pero no los STF de un paciente sano, se adherían e invadían el cartílago, expresando moléculas de adhesión y varias integrinas que facilitaban el anclaje al cartílago e inducían la producción de proteasas que degradaban la matriz extracelular. Por lo tanto se concluyó que por sí mismos los STF en la AR eran capaces de promover la destrucción del cartílago (Muller-Ladner et al., 1996).

El fenotipo agresivo de los STF en la AR es multifactorial. La exposición crónica a citocinas proinflamatorias y las mutaciones somáticas en genes que regulan el ciclo celular, la proliferación y la apoptosis se consideran como los factores más importantes. Por ejemplo, la mutación más caracterizada ha sido documentada en el gen supresor de tumores p53, pues su inactivación en STF normales induce el fenotipo invasivo y destructor de los STF artríticos sobre el cartílago en ratones SCID (Pap, 2001). Es importante entender que las mutaciones en los STF no causan la AR, sino que son el resultado de un entorno genotóxico crónico. Una vez que se producen las mutaciones, pueden alterar el proceso patológico de la AR debido al aumento de la expresión de citocinas, quimiocinas y proteasas en los sinoviocitos, la disminución de la apoptosis y el aumento de su potencial invasivo (Bartok y Firestein, 2010).

La mayoría de las citocinas clásicas implicadas en la AR derivan de los macrófagos. Sin embargo, los STF son la principal fuente de IL-6 como lo demuestran los estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Así pues, el papel fundamental de los sinoviocitos en la patogénesis de la enfermedad está evaluado por estudios recientes que demuestran que la inhibición de la IL-6 disminuye drásticamente los signos y síntomas de la AR. Los STF cultivados producen IL-6 de forma espontánea, y su producción aumenta

notablemente cuando son tratados con IL-1 β o TNF- α a través de una vía dependiente de NF- κ B (Brennan y McInnes, 2008).

Bajo la influencia de las citocinas proinflamatorias, los STF producen una gran cantidad de enzimas responsables de la remodelación y destrucción de la matriz extracelular característica de la AR. En este proceso intervienen muchas clases de enzimas, como las serinproteasas y las catepsinas (Keyszer et al., 1995), pero las MMP son probablemente las más importantes (Burrage et al., 2006). Esta familia de proteasas está compuesta por al menos 13 miembros estructuralmente relacionados, cada uno de los cuales tiene controles reguladores característicos y especificidad de sustrato (Woessner Jr, 1991). Dentro de las MMPs más importantes en la AR se encuentran las colagenasas (MMP-1, MMP-13) y las estromelisininas (MMP-3), las cuales degradan a la colágena (colagenasas) y los proteoglicanos (estromelisininas), principales componentes de la matriz extracelular del tejido articular (Burrage et al., 2006). La MMP-3 también contribuye con la activación de la proMMP-1, lo que determina una doble acción de las estromelisininas en la degradación de la matriz extracelular (Unemori et al., 1991). La síntesis y activación de estas proteasas en los STF es inducida por IL-1 β y TNF- α (Han, 2001) y especies reactivas de oxígeno (NO) (Hirai et al., 2001). Además, se ha determinado que la capa íntima es la principal fuente de MMP en la AR, y los estudios de hibridación *in situ* localizan el ARN mensajero de la colagenasa y la estromelisinina casi exclusivamente en los STF corroborando el papel protagónico de este tipo celular en la degradación del tejido de la cavidad articular (Gary S Firestein et al., 1991; McCachren et al., 1990).

Los STF también desempeñan un papel determinante en el reclutamiento de células inmunes a la cavidad articular a través de la liberación de factores quimioatrayentes denominados quimiocinas. Las quimiocinas se clasifican en cuatro familias distintas basándose en su homología estructural respecto a la localización de dos de los cuatro residuos de cisteína conservados (C-X-C, C-C, C y C-X3-C) (Szekanecz et al., 2003). Cada familia tiene cierta especificidad por el tipo de célula inmune que recluta, por ejemplo, las C-X-C están principalmente involucradas en la quimiotaxis de neutrófilos, mientras que las CC monocitos y las C y C-X3-C linfocitos. Los STF derivados de pacientes con AR son capaces de producir quimiocinas pertenecientes a las 4 familias. Por ejemplo, se ha observado que en respuesta a citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF α), los STF producen los quimioatrayentes CCL2 [o proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)] y CXCL1 [o proteína reguladora de crecimiento α (gro- α)] que son los principales reclutadores de monocitos y neutrófilos, respectivamente (Bartok y Firestein, 2010; A. E. Koch et al., 1995).

2.2.1.2. Implicación de los vasos sanguíneos en la AR

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente (angiogénesis) es importante desde las primeras etapas del desarrollo embrionario hasta la vida adulta, y desempeña un papel clave en procesos fisiológicos como la reparación de heridas o fracturas, así como el ciclo reproductor femenino. Sin embargo, la desregulación de este proceso determina la progresión de enfermedades angiogénico-dependientes entre las que se encuentra el cáncer (Nishida et al., 2006), las retinopatías vasoproliferativas (Crawford et al., 2009) y la artritis (Elshabrawy et al., 2015).

En una revisión realizada en 2007, Judah Folkman clasificó la AR, junto con otras enfermedades inflamatorias, como un padecimiento dependiente de la angiogénesis, lo cual implica que su inhibición tiene relevancia en el tratamiento de este tipo de artropatías (Folkman, 2007).

La angiogénesis desempeña un papel importante en el desarrollo de la AR debido a que los nuevos vasos sanguíneos alimentan el tejido inflamado y promueven el reclutamiento de leucocitos, permitiendo así el crecimiento del pannus, el cual a su vez destruye el cartílago y el hueso (MacDonald et al., 2018). En primer lugar, el suministro de nutrientes y oxígeno alimenta el tejido inflamatorio que se encuentra en crecimiento. En segundo lugar, el incremento en el número de vasos sanguíneos incrementa la vía de entrada de las células inmunes a la cavidad articular. Los vasos sanguíneos en la membrana sinovial de pacientes con AR expresan una gran cantidad de moléculas de adhesión que promueven la migración transendotelial de las células inflamatorias a la articulación (Middleton et al., 2004). En la AR las células endoteliales aumentan la expresión de los contrarreceptores del antígeno tardío (VLA)-4 (VCAM-1 y la fibronectina), los ligandos de la integrina $\beta 2$ (ICAM-1) y las selectinas E y P que contribuyen al reclutamiento de linfocitos, monocitos y neutrófilos (!!! INVALID CITATION !!! {}). Por último, la expresión incrementada de citocinas proinflamatorias y quimiocinas por parte del endotelio vascular desempeña un papel fundamental en la sinovitis al favorecer la adhesión e infiltración de los leucocitos (Gary S. Firestein, 1999).

En la membrana sinovial se producen muchos promotores de la angiogénesis. Entre ellos destacan factores de crecimiento como el VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (A. Koch, 2003; Lainer-Carr y Brahn, 2007). Además, en la AR en el tejido sinovial

produce y secreta al líquido sinovial otros factores proangiogénicos que incluyen las propias citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-17), quimiocinas (CXCL-8) y MMP (Szekanecz et al., 2009).

La expresión de muchos de los factores proangiogénicos está regulada por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF)(Westra et al., 2010). El factor de transcripción HIF consta de una subunidad inducible regulada por oxígeno (HIF-1 α) y una subunidad β expresada constitutivamente en el núcleo (HIF-1 β). La regulación de la expresión génica dependiente de HIF requiere de la acumulación de la subunidad 1 α en el citoplasma y su translocación al núcleo, lo que le permite su dimerización con las subunidades 1 β encontradas en el núcleo. Los heterodímeros de HIF son entonces reconocidos por los coactivadores y se unen a los elementos de respuesta a la hipoxia en el gen diana para iniciar la transcripción de genes (Leblond et al., 2017).

La hiperplasia de la capa íntima de la membrana sinovial fomenta la hipoxia local crónica, lo que induce la expresión de HIF-1 α , que a su vez regula la expresión de genes que permiten que las células utilicen el metabolismo anaeróbico para generar energía y sobrevivir y, en segundo lugar, promover la angiogénesis para el suministro de oxígeno (Westra et al., 2010). Dentro de los factores proangiogénicos inducidos por HIF, el más importante es el VEGF (Forsythe et al., 1996; E. M. Paleolog, 2002b). La doble actividad del VEGF, primero como mitógeno de las células endoteliales y segundo, como modulador de los cambios en la permeabilidad vascular, es de importancia en la patogénesis de la AR(A. O. Afuwape et al., 2002). Estudios demuestran que los niveles de VEGF en el líquido sinovial y en la circulación se encuentran aumentados y correlacionan con marcadores de inflamación como la proteína C reactiva y el número de articulaciones inflamadas (Harada, 1998). Los ratones deficientes de VEGF muestran una reducción del pannus y la angiogénesis (Mould et al., 2003) y el bloqueo de su actividad con sFlt1 (el dominio extracelular soluble del receptor 1 del VEGF) (Miotla et al., 2000), o con anticuerpos contra el VEGF o su receptor VEGFR1 (Michel De Bandt et al., 2003; Lu et al., 2000; Sone et al., 2001), disminuye la inflamación y la destrucción articular en modelos de artritis experimental.

Sin embargo, aunque el tratamiento del VEGF en modelos de la enfermedad ha sido eficaz, los efectos secundarios de terapias anti-VEGF como el bevacizumab promueven un mayor riesgo de eventos tromboembólicos (Scappaticci et al., 2007). Debido a que la AR es una enfermedad que puede derivar en enfermedades cardiovasculares, es importante estudiar tratamientos alternativos (Kaplan, 2006). Una posible terapia alternativa es la hormona PRL con acciones antiinflamatorias, así como su fragmento antiangiogénico (vasoinhibina) derivado de su corte proteolítico.

2.2.2 Erosión ósea

El recambio óseo es un proceso mediado principalmente por células que forman el hueso, los osteoblastos y otras que lo reabsorben, los osteoclastos. La remodelación ósea, en condiciones fisiológicas requiere de una participación coordinada de resorción y formación de hueso, lo cual dependerá del desarrollo y activación de osteoclastos y osteoblastos, respectivamente (Kini y Nandeesh, 2012). La pérdida del balance entre estos dos tipos celulares hacia el incremento de los osteoclastos ocasiona la erosión ósea en diversas patologías inflamatorias incluyendo la AR. Los osteoclastos producen enzimas como MMP-9, catepsina K y fosfatasas (fosfatasa ácida tartrato resistente [TRAP]) que degradan la matriz ósea incluyendo la colágena que en exceso conduce a la destrucción del hueso (Kini y Nandeesh, 2012).

En la AR, la erosión ósea ocurre rápidamente afectando al 80% de los pacientes a solo un año de haber sido diagnosticados y es asociado con el incremento en la inflamación articular (Visser et al., 2002). Las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) generadas por las células del pannus estimulan la síntesis en los STF del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y del ligando del receptor activador del NF- κ B (RANKL), factores que promueven la osteoclastogénesis en consecuencia, la erosión ósea (G. Schett y Teitelbaum, 2009).

Estudios previos han demostrado que la inhibición del TNF- α , la IL-6 y el RANKL retrasa la erosión ósea en la AR. En particular, el bloqueo del RANKL detiene la reabsorción ósea, pero no modifica la inflamación o la degradación del cartílago (Georg Schett et al., 2008).

2.2.3 Degradación del cartílago

El pannus contribuye a la degradación del cartílago en la AR. Por un lado, la pérdida de las funciones normales del tejido sinovial, como la reducción en la expresión de lubricina, reduce las propiedades reostáticas del líquido sinovial y pone ende la protección del cartílago, además de que altera la proliferación y adhesión de los STF (Hill et al., 2014) lo cual favorece que invadan el cartílago. Por otro lado, en respuesta a las citocinas proinflamatorias (IL1 β , IL6 y TNF α), los STF producen MMPs, particularmente las MMP-1,

3, 8, 13, 14 y 16, las cuales promueven la ruptura de la colágena tipo II, uno de los principales elementos que, junto con los glucosaminoglicanos, forman la matriz extracelular del cartílago (Bartok y Firestein, 2010).

Además, por acción de las citocinas proinflamatorias se conoce que tanto los STF como los propios condrocitos incrementan la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) con la consecuente formación de NO, cuyos niveles están relacionados con el grado de lesión del cartílago (Blanco et al., 1995; Dey et al., 2016; Schuerwegh et al., 2003). Estudios demuestran que el NO es capaz de inducir apoptosis en los condrocitos y la inhibición de la síntesis del NO por los tejidos de la articulación retarda la degeneración del cartílago (Blanco et al., 1995).

2.3. Prolactina

La PRL es una hormona polipeptídica de 199 aminoácidos que es sintetizada y secretada por las células lactotropas de la hipófisis anterior (Freeman et al., 2000). La hormona recibió su nombre debido a sus efectos sobre la producción de leche en la lactancia. Sin embargo, hoy en día sabemos que la PRL tiene más de 300 actividades biológicas distintas que no están representadas por su nombre. De hecho, la PRL desempeña funciones dentro y fuera de la reproducción regulando múltiples procesos asociados a la osmorregulación, el crecimiento, el metabolismo, la inmunorregulación, la angiogénesis y la función cerebral, entre otros (Nira Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998; C. Clapp et al., 2015; Costanza et al., 2015).

La PRL es miembro de la familia hematopoyética de citocinas que comparten una estructura tridimensional que consta de cuatro α -hélices dispuestas de forma antiparalela y unidas por asas flexibles (Horseman y Yu-Lee, 1994). Los receptores de la PRL también comparten características estructurales y funcionales con la superfamilia de receptores hematopoyéticos, señalizando a través de la vía clásica de la cinasa de tirosina Janus - 2 (JAK2) y los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT); la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/AKT) y la vía de la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) (Freeman et al., 2000).

Ahora sabemos que la síntesis y secreción de esta hormona no se limita a la hipófisis anterior, numerosos tejidos extrapituitarios tienen esta capacidad y en conjunto con la expresión ubicua del receptor de PRL nos muestra la participación de esta hormona más allá de los tejidos involucrados en la reproducción (Nira Ben-

Jonathan et al., 1996; Marano y Ben-Jonathan, 2014). Los tejidos de la articulación expresan tanto a la PRL como a su receptor. La PRL está presente en el líquido sinovial (Ogueta et al., 2002) y se produce por distintas células de la articulación como los condrocitos (Macotela et al., 2006), sinoviocitos (Nagafuchi et al., 1999), el endotelio vascular (C. Clapp et al., 1998) y las células inmunes (Montgomery, 2001).

2.3.1 Efectos sobre componentes de la articulación

La PRL se ha asociado con múltiples efectos sobre distintos componentes articulares como lo son el hueso, el cartílago, los vasos sanguíneos y las células inmunes (C. Clapp et al., 2016). En el hueso la PRL participa tanto en inhibir como estimular la formación y reabsorción del hueso y se piensa que su función en uno y otro sentido depende de la edad y el estado fisiológico. En ratas en etapa de crecimiento el tratamiento con PRL incrementa la formación del hueso y el contenido de calcio (Krishnamra y Cheeveewattana, 1994), mientras que en ratas maduras en las etapas de embarazo y lactancia estimula la reabsorción del hueso y con ello la liberación de calcio para el crecimiento del feto y la producción de leche (C. Clapp et al., 2016; Lotinun et al., 1998).

Derivado del estudio de los ratones nulos para el receptor de PRL, la PRL parece no tener un efecto sobre la formación y crecimiento del cartílago. No obstante, la PRL podría contribuir en el mantenimiento del cartílago en el adulto a través de regular la diferenciación y supervivencia de los condrocitos (C. Clapp et al., 2016). *In vitro*, la PRL estimula la diferenciación de las células madre pluripotentes mesenquimales humanas a condrocitos (Ogueta et al., 2002) e inhibe su apoptosis (Zermeno et al., 2006). Debido a que el cartílago es un tejido avascular, se propone que junto con otros factores la PRL presente en el líquido sinovial y secretada por los condrocitos actúa de forma paracrina/autocrina en el mantenimiento de este tejido articular.

Los vasos sanguíneos de la membrana sinovial son esenciales para el mantenimiento del tejido y la formación del líquido sinovial. Sin embargo, en la AR, la angiogénesis determina el crecimiento y mantenimiento del pannus (E. M. Paleolog, 2002a). Estudios *in vivo* demuestran que la PRL promueve la angiogénesis en el cuerpo lúteo (Gaytan et al., 1997), el corazón (Hilfiker-Kleiner et al., 2007), el páncreas (Johansson et al., 2009) y el hígado (Moreno-Carranza et al., 2013) a través de efectos directos como la proliferación y migración de las células endoteliales e indirectos como el incremento en la expresión del

VEGF (Goldhar et al., 2005). No obstante, la participación de esta hormona sobre el endotelio vascular es más complejo. La falta de expresión de PRL incrementa la angiogénesis en la retina y se asocia con una alta vascularización en los tumores hipofisarios (Aranda et al., 2005; Cruz-Soto et al., 2002). Este efecto dual de la PRL podría deberse a la escisión catalítica de la hormona por MMPs, lo que da paso a la vasoinhibina, una familia de péptidos que reducen la angiogénesis y vasopermeabilidad (C. Clapp, Gonzalez, et al., 2006).

2.3.2 Efectos sobre la inflamación

La acción de la PRL sobre la inflamación no es sorprendente. Tanto la PRL como su receptor se expresan en diversos tipos de célula inmunes donde regulan varias respuestas, incluyendo la proliferación y supervivencia de los linfocitos T, la producción de anticuerpos por los linfocitos B, la proliferación y citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) y las funciones efectoras de los macrófagos (C. Clapp et al., 2016; Pereira Suarez et al., 2015).

La PRL es capaz tanto de estimular como inhibir la inflamación. Se propone que su efecto en uno u otro sentido podría explicarse en función a su concentración o interacciones complejas en el microambiente. En estudios tanto *in vivo* e *in vitro* se ha determinado que niveles más bajos de PRL se asocian con efectos inmunoestimuladores, mientras que niveles más altos con efectos inmunosupresores (C. Clapp et al., 2016). Por ejemplo, en un modelo de ratón (inmunizado con glóbulos rojos de oveja) una dosis baja de PRL (100 µg/rata) estimula la producción de anticuerpos y la proliferación de linfocitos T, mientras que una dosis alta (400 µg/rata) es inhibitoria (Spangelo et al., 1987). Además, en cultivo se observó que concentraciones bajas de PRL (12-25 ng/ml) estimulan la proliferación de células NK y de linfocitos T, mientras que concentraciones más altas (100-200 ng/ml) la inhiben (Matera et al., 1992).

Como se hablará posteriormente, el microambiente podría también repercutir en el efecto de la PRL sobre la inflamación. Esta posibilidad se deriva de condiciones que regulen la cantidad y actividad de las proteasas que promueven su procesamiento hacia vasoinhibina (C. Clapp et al., 2016; Carmen Clapp et al., 2022).

2.4 Vasoinhibina

La vasoinhibina deriva de la escisión proteolítica de la PRL. La vasoinhibina comprende una familia de fragmentos de PRL que van de 5,6 a 18 kDa y que corresponden a los primeros 48 a 159 residuos de aminoácidos de acuerdo con el sitio de corte en la PRL generado por las MMP (Macotela et al., 2006), la catepsina D (Piwnica et al., 2004), la proteína morfogenética ósea 1 (Ge et al., 2007), la trombina (Zamora et al., 2021) y la plasmina (Friedrich et al., 2021). Dado que la mayoría de estas enzimas escinden la PRL completa en varios sitios cerca o dentro del asa larga que conecta la tercera y la cuarta α -hélice, la proteólisis por estas enzimas genera vasoinhibinas de masas moleculares variadas. Todas las vasoinhibinas comparten la región NH₂-terminal de la PRL completa. Por otro lado, el fragmento COOH-terminal que surge de la proteólisis de la PRL no posee actividad vascular (Khurana et al., 1999).

2.4.1 Efectos sobre los vasos sanguíneos

La vasoinhibina inhibe la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad y promueve la regresión vascular en la córnea [129], la retina [127, 130], el corazón [113] y los tumores implantados [85]. Actúa directamente sobre las células endoteliales para inhibir la acción de varias sustancias vasoactivas, como el VEGF, el FGF-2, la IL-1 β , la bradiquinina y la acetilcolina [130-135]. Recientemente se descubrió que las propiedades antiangiogénicas de la vasoinhibina como la inhibición de la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales implica la unión de la vasoinhibina a un complejo multimolecular conformado por el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el activador del plasminógeno de la uroquinasa (uPA) y el receptor del activador del plasminógeno de la uroquinasa (uPAR) (Bajou et al., 2014).

La unión de la vasoinhibina al complejo PAI-1/uPA/uPAR y a otras proteínas de unión en membranas de células endoteliales (C. Clapp y weiner, 1992), inhibe la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad mediante mecanismos que incluyen: (1) el arresto del ciclo celular a través de bloquear la vía de señalización de las MAPK a nivel de Ras, reduciendo la ciclina D1 e incrementando p21 (vía Ras-Raf-MAPK) (D'Angelo et al., 1999); (2) la inhibición de la migración de las células endoteliales a través del bloqueo de la vía Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 (S. H. Lee et al., 2007); (3) la apoptosis de las células endoteliales a través de la activación de las caspasa 8 y 9 mediante la vía de NF- κ B, lo que activa la fragmentación del ADN (Tabruyn et al., 2003).

Los mecanismos anteriores regulan principalmente la angiogénesis. Sin embargo, la vasoinhibina también posee un potente efecto inhibitorio en la dilatación y permeabilidad vascular. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y la subsecuente producción de NO son eventos que promueven estos procesos vasculares incluyendo la angiogénesis (Fukumura et al., 2001). La vasoinhibina inhibe la activación de eNOS inducida por sustancias vasoactivas presentes en la artritis como son el VEGF (García et al., 2008) y la bradicinina (Thebault et al., 2011) a través de: (1) inhibir la movilización calcio y formación del segundo mensajero Ca²⁺/calmodulina, indispensable para la activación eNOS (Gonzalez et al., 2004); y (2) reducir la fosforilación/activación de la eNOS a través de activar a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (García et al., 2008).

Los efectos antiangiogénicos e inhibitorios de la dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos de la vasoinhibina la hacen un excelente opción terapéutica para patologías que dependen del crecimiento, dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos como el cáncer (Nishida et al., 2006), las retinopatías vasoproliferativas (Crawford et al., 2009) y la artritis (Elshabrawy et al., 2015). En este sentido se han realizado múltiples estudios que demuestran su posible acción terapéutica en el cáncer (Nguyen et al., 2007) y la retinopatía diabética (Ramírez et al., 2011). Sin embargo, hasta el momento no se tenía ningún estudio que probara su posible implicación terapéutica en artropatías vasoproliferativas como la AR. El presente trabajo de tesis y uno de los 2 artículos científicos resultantes muestran la primera evidencia de los efectos vasculares de la vasoinhibina en un modelo de artritis experimental y su posible implicación terapéutica en la AR (Georgina Ortiz et al., 2020).

2.4.1 Efectos sobre la inflamación

Debido a que la vasoinhibina tiene una amplia gama de efectos derivados de su intervención en múltiples vías de señalización, fue necesario el uso de técnicas de análisis del genoma para dilucidar nuevos mecanismos de acción. En este sentido, Tabruyn y col. (2007) mediante el uso de microarreglos identificaron 216 genes regulados por la vasoinhibina en células endoteliales de los cuales una gran proporción resultó estar asociada con la inflamación. El estudio demostró que la vasoinhibina induce la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 α), quimiocinas (CXCL1-3 y CCL2) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y e-selectina) en el endotelio vascular. Además, demostraron que a través de la expresión de estas moléculas la vasoinhibina estimula la adhesión de leucocitos a las células endoteliales

y la infiltración de leucocitos en los tumores mediante la vía de NF- κ B (Tabruyn et al., 2007). La activación de NF- κ B en células endoteliales parece ser determinada por la unión de la vaso inhibina al complejo PAI-1/uPA/uPAR pues el silenciamiento de PAI-1 y uPAR a través del uso de ARN pequeños de interferencia (siARN) bloqueó la activación de NF- κ B inducida por la vaso inhibina (Bajou et al., 2014).

Además de los resultados sobre células endoteliales y en apoyo a los efectos proinflamatorios de la vaso inhibina, estudios realizados en nuestro laboratorio determinaron que la vaso inhibina actúa como una potente citocina proinflamatoria, a través de la activación de NF- κ B, para estimular la expresión de la iNOS y la producción de NO en los fibroblastos y las células epiteliales de tipo II del pulmón (Corbacho et al., 2000; Macotela et al., 2002), que son células importantes para las reacciones inflamatorias en las vías respiratorias.

El efecto proinflamatorio de la vaso inhibina en las células endoteliales ha sido relacionado con sus efectos antitumorales debido a que la inmunidad celular en contra del tumor es una estrategia terapéutica (Tabruyn et al., 2007). Sin embargo, un efecto proinflamatorio podría ser deletéreo en otro tipo de patologías vasoproliferativas como la AR, cuya fisiopatología está íntimamente relacionada con un proceso proinflamatorio (I. B. McInnes y Schett, 2011). Por lo que en el presente trabajo determinamos además de las acciones de la vaso inhibina vía antiangiogénesis, sus posibles efectos proinflamatorios *in vivo* en un modelo murino de artritis experimental e *in vitro* en STF en cultivo.

2.5 Implicación del eje PRL/Vaso inhibina en la AR

La implicación tanto de la PRL como del eje PRL/vaso inhibina en la AR se abordó en dos revisiones publicadas por nuestro grupo de trabajo en el 2016 y 2022, respectivamente. El interés por investigar la relación entre la PRL y la AR fue esencialmente consecuencia de que la prevalencia de la enfermedad es mayor en mujeres que en hombres (75%) (Whitacre et al., 1999), que éstas presentan niveles más elevados de PRL que los hombres (N. Ben-Jonathan et al., 2008) y que durante la lactancia (estado fisiológico de hiperprolactinemia) la AR se agrava (Barrett et al., 2000). No obstante, el papel de la PRL en la AR no se encuentra totalmente dilucidado (C. Clapp et al., 2016). Se ha reportado que la lactancia materna durante más de 12 meses disminuye el riesgo de desarrollar AR (Karlson et al., 2004) y que durante el embarazo la AR mejora o remite (Ostensen y Villiger, 2007). Además, la relación entre los niveles de PRL y la gravedad

de la enfermedad no siempre correlaciona (C. Clapp et al., 2016). Otros estudios han demostrado que los pacientes con AR tienen altos niveles de PRL en comparación con aquellos con osteoartritis o sujetos sanos (Fojtikova et al., 2010; Mateo et al., 1998), mientras que algunos más, reportan concentraciones fisiológicas (Kramer et al., 2005) o incluso más bajas (E. Nagy et al., 1991) sin clara relación con la gravedad de la enfermedad. Además, la disminución de los niveles circulantes de PRL derivada de un tratamiento con bromocriptina, un agonista de los receptores D2 de dopamina (principal inhibidor de la secreción de PRL por la adenohipófisis), se ha asociado tanto con la mejoría (Figuroa et al., 1997) como con la progresión del padecimiento (Salesi et al., 2013).

Los efectos duales de la PRL en la AR podrían derivar de alteraciones en su concentración, ya que se tiene evidencia de que en cultivos de célula inmunes, los niveles bajos de PRL son inmunoestimuladores (12-25 ng/ml) y los altos (100-200 ng/ml) inmunosupresores (Matera et al., 1992). Sin embargo, la determinación de la concentración de PRL en la cavidad articular no es sencilla, ya que los diversos componentes de la articulación la producen y/o metabolizan (Carmen Clapp et al., 2022). Por ejemplo, las células inmunes infiltradas y los STF de pacientes con AR producen PRL (Nagafuchi et al., 1999), que puede ser convertida a vasoinhibina por acción de las proteasas como MMPs (I. B. McInnes y Schett, 2011).

Es aquí donde nace el concepto de eje PRL/vasoinhibina. Éste fue descrito recientemente y plantea que los niveles de PRL y vasoinhibina se regulan mediante EL eje hipotálamo-adenohipófisis-microambiente del tejido blanco (Triebel et al., 2015). La alteración de este eje contribuye a la patogénesis y progresión de múltiples patologías entre las que se incluye la retinopatía diabética (Triebel et al., 2011), la preclamsia (Gonzalez et al., 2007) y, derivado de los hallazgos de este proyecto de tesis, las artritis inflamatorias (Georgina Ortiz et al., 2020; Ortiz et al., 2022). Debido que la fisiopatología de la AR se debe fundamentalmente a la angiogénesis y a la inflamación, se propone que la regulación de este eje es importante para su progresión.

Para estudiar la participación del eje PRL/vasoinhibina en la AR se han utilizado distintos modelos animales, entre los que se incluyen la artritis inducida por adyuvante completo de Freund (AA) la cual puede derivar en poliartritis (en ratas) o en monoartritis (en ratones); y el modelo murino de artritis inducida por antígeno (AIA) en el que, a través de la inyección intraarticular de un antígeno como la albúmina de suero bovino metilada (mBSA) en un ratón previamente inmunizado, se provoca una inflamación monoarticular aguda. Ambos son modelos muy robustos y han sido ampliamente utilizados para evaluar la acción de numerosos

agentes antiartríticos que están en fase de investigación preclínica o clínica o que se utilizan actualmente como agentes terapéuticos para esta enfermedad (Bendele, 2001).

El primer estudio realizado en modelos animales se publicó en 1982 y en él se apoyó la relación negativa de la PRL en la AR. Se observó que la hipofisectomía impedía el desarrollo de la AA en la rata a menos que fuera tratada con PRL y que la AA generada en ratas intactas disminuía bajo un tratamiento con bromocriptina (Berczi y Nagy, 1982). Sin embargo, la conclusión se oscurece por los hechos de que la hipofisectomía genera una deficiencia adrenocortical y la bromocriptina puede tener acciones inmunosupresoras independientes de la inhibición de la PRL (Morikawa et al., 1994).

Una década después se demostró que la hiperprolactinemia inducida por explantes adenohipofisarios reducía la severidad de la AA en la rata (Neidhart y Flückiger, 1992). El efecto antiinflamatorio de la PRL fue confirmado recientemente en nuestro grupo de trabajo al demostrar que la hiperprolactinemia inducida por explantes adenohipofisarios, el tratamiento sostenido con PRL mediante bombas de infusión subcutánea o la administración del bloqueador de los receptores D2 de la dopamina (haloperidol), reduce la inflamación y el dolor articular, la pérdida de cartílago y la erosión ósea en ratas bajo el modelo de AA a través de disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ), la apoptosis de los condrocitos y el número de osteoclastos (Adan et al., 2013; Ledesma-Colunga et al., 2017).

Un factor que puede contribuir a explicar las acciones opuestas de la PRL en la AR es su conversión a vasoinhibina, una proteína antiangiogénica y proinflamatoria, que podría tanto mejorar como empeorar la progresión de la artritis. En el presente trabajo generamos las primeras evidencias de los efectos potencialmente benéficos (vía antiangiogénesis) (Georgina Ortiz et al., 2020) y en contraste los deletéreos (proinflamatorios) (Ortiz et al., 2022) de la vasoinhibina, tanto *in vivo* en un modelo de AIA como *in vitro* en cultivos de STF. Los resultados presentan evidencia de los efectos opuestos de la PRL en la AR, los cuales se extienden a la vasoinhibina, reforzando la hipótesis de que la regulación del eje PRL/vasoinhibina juega un papel relevante en el desarrollo y progresión de esta patología.

3 JUSTIFICACIÓN

Las artropatías inflamatorias comprenden un grupo amplio de padecimientos que producen discapacidad en vastos sectores de la población. Entre éstas se destaca la AR la cual afecta predominantemente a las mujeres y su progresión puede mejorar, pero también empeorar bajo condiciones de hiperprolactinemia fisiológica (embarazo y lactancia). Los mecanismos por los cuales la PRL presenta acciones opuestas sobre la respuesta inflamatoria no son claros, pero podría involucrar su corte proteolítico a vasoinhibina. Con base en lo anterior, resulta indispensable esclarecer el(los) mecanismo(s) específico(s) de la vasoinhibina, para entender su papel fisiológico y fisiopatológico, lo cual además de permitir explicar las acciones opuestas de la PRL en este tipo de respuesta inflamatoria, contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la AR.

4 HIPÓTESIS

La vasoinhibina se genera durante condiciones inflamatorias asociadas a altas concentraciones de proteasas como la artritis inflamatoria y ejerce acciones opuestas sobre la inflamación. Inhibe la inflamación articular a través de disminuir la vascularización del pannus y estimula la inflamación a través de promover la producción de citocinas proinflamatorias en los STF.

5 OBJETIVOS

- 5.3 Evaluar el efecto de la vasoinhibina sobre la progresión de la artritis inducida por antígeno (AIA) leve y grave.
- 5.4 Evaluar si los STF son blancos celulares de las acciones inflamatorias de la vasoinhibina.
- 5.5 Evaluar la presencia de la vasoinhibina en la articulación de ratones sanos y bajo condiciones de inflamación.
- 5.6 Analizar la actividad de las proteasas capaces de generar vasoinhibina en la articulación de ratones con AIA.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3 MATERIALES

6.3.1 Reactivos

La vasoinhibina (correspondiente a los primeros 123 aminoácidos de la PRL humana) utilizada en los experimentos *in vitro* se produjo de manera recombinante en células de insecto de acuerdo al método publicado (Galfione et al., 2003). La PRL de rata utilizada en los ensayos de corte y como estándar en el Western blot fue adquirida del National Hormone and Pituitary Program (NHPP) y del doctor A.F. Parlow. El estándar de vasoinhibina de 16 kDa fue generado mediante el corte proteolítico de la PRL recombinante de rata con el extracto de glándula mamaria según el método publicado (C. Clapp, 1987).

6.3.2 Animales

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 8-10 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estándar (22°C, ciclos de luz oscuridad de 12:12; y alimento ad libitum) de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) del Consejo Nacional de Investigación (National Research Council, NRC) en su octava edición (National Academy Press, Washington, DC, USA). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron anestesiados con 70% de ketamina y 30% de xilacina (1 μ L / g de peso i. p.) antes de realizar las inyecciones intradérmicas e intraarticulares requeridas en los diferentes modelos experimentales.

6.4 MÉTODOS

6.4.1 Modelo de artritis inducida por antígeno (AIA)

Se implementó el modelo de AIA según el método publicado (Brackertz et al., 1977). Brevemente, ratones macho C57BL/6 (20-25g) fueron inmunizados intradérmicamente con 40 μ l de una mezcla 1:1 del antígeno, albúmina de suero bovino metilada (mBSA; 10 μ g/ μ l; Sigma, St. Louis, MO) y adyuvante completo de

Freund (CFA; 5 µg/ µl; Difco Laboratories, Detroit, MI) e inyectados i.p. con 10 µl de toxina pertussis (10 ng/µl; Sigma, St. Louis, MO) 21 y 14 días antes de la inducción de artritis (día -21 y -14). La inducción de la artritis grave y leve se realizó el día 0 mediante la inyección intraarticular en la rodilla de 20 o 2.5 µg del antígeno (mBSA), respectivamente. El sacrificio de los animales fue por decapitación 6 días después de la inyección intraarticular. Se colectó sangre para recuperar suero y se extrajeron las articulaciones de la rodilla para el análisis de la expresión de genes y la histología (Figura 3A).

6.4.2 Inyección intraarticular de citocinas

Ratones C57BL/6 fueron inyectados en el espacio articular de la rodilla con una combinación de citocinas (62.5ng de TNF- α , 25ng de IL-1 β , y 25ng de IFN- γ) en un volumen final de 10 µl. Cuarenta y ocho horas después de la inyección, los animales fueron anestesiados con CO₂ y decapitados para extraer sangre y aislar el suero para evaluar la presencia de vasoinhibina mediante inmunoprecipitación. La combinación y concentración de citocinas proinflamatorias se seleccionó con base en una publicación anterior que demostró que la administración intraarticular producía la apoptosis de los condrocitos en un modelo de artritis por adyuvante en ratas (Adan et al., 2013).

6.4.3 Sobreexpresión de la vasoinhibina mediante el vector viral AAV2-Vi en AIA

El efecto de la vasoinhibina sobre la progresión de la AIA se evaluó mediante la inyección intraarticular de un vector recombinante derivado de virus adeno-asociados tipo-2 (AAV2) que contiene como transgén una vasoinhibina de 139 aminoácidos (AAV2-Vi), que es una de las más estudiadas (Díaz-Lezama et al., 2016; Ramírez et al., 2011). Se utilizó como control un AAV2 que en lugar de transgen contiene un fragmento de DNA no codificante por lo que se define como nulo ("null vector", AAV2-null). Ambos vectores fueron producidos y donados por Zhijian Wu (National Eye Institute, Bethesda, Maryland). Los AAV2-Vi y -null (6.7 x 10⁹ vg) se inyectaron en el espacio articular de la rodilla un día antes de la primera inmunización (día -22). Mediante qRT-PCR se determinó la expresión del transgén en las articulaciones de animales sanos y artríticos.

6.4.4 Análisis histopatológico de la articulación

6.4.4.1 Evaluación del pannus y la densidad celular

Las rodillas se fijaron en 10% de formalina por 2 días, se descalcificaron en una solución al 14% de EDTA pH7 por 2 semanas, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Secciones de 3µm de espesor de la articulación femorotibial fueron teñidas con la solución hematoxilina de Harris y eosina para evaluar el pannus y la densidad celular. El área del pannus fue trazada y evaluada en una porción fija de la articulación femorotibial usando el software de análisis de Image-Pro Plus (Versión 7, Media Cybernetics Inc.). La densidad celular se evaluó a través de cuantificar la densidad de los núcleos teñidos por área de membrana sinovial (Image-Pro Plus; Media Cybernetics Inc.).

6.4.4.2 Inmunohistoquímica de células inmunes

La infiltración de células inmunes se evaluó mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo contra CD11b, un marcador de superficie para células mieloides, incluidos monocitos/macrófagos, neutrófilos, células NK y subconjuntos de linfocitos B y T (Ratcliffe, 2016). Las secciones de parafina de 5 µm de grosor se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 durante 8 minutos a temperatura ambiente; a continuación, los portaobjetos se sometieron a una recuperación de antígenos en una solución tampón de citrato de sodio (10 mM de citrato trisódico, 0.05% de Tween-20, pH 6,0) durante 2 minutos a 95-100 °C. Las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD11b (1:500, catálogo ab133357, Abcam, Cambridge, UK) por 12 horas a 4°C y posteriormente con el anticuerpo secundario biotinilado (1:2000, Vectastain Elite ABC kit, catálogo # PK-6101, Vector Laboratories) durante 2 horas seguido del reactivo ABS (Vectastain Elite ABC kit, catálogo # PK-6101, Vector Laboratories) por 30 minutos. La reacción se reveló adicionando el sustrato DAB (DAB Substrate Kit, catálogo #SK-4100, Vector Laboratories), y se contratiñó con azul de toluidina. El número de células CD11b+ infiltradas por mm² de membrana sinovial o pannus se cuantificó utilizando el software de análisis Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

6.4.4.3 Determinación del área del hueso y la densidad de osteoclastos

La densidad de osteoclastos en el hueso trabecular y cortical se evaluó mediante la tinción de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), una enzima cuya actividad se considera como un marcador citoquímico establecido para reconocer osteoclastos multinucleados en secciones óseas (Baron et al., 1986). Las secciones en parafina de 7 µm de grosor se desparafinaron, rehidrataron e incubaron durante 3 h a 37°C en el 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], y agua destilada [200 ml]; pH5). Las muestras se lavaron con agua destilada y contratiñeron con hematoxilina de Weigert (Sigma Aldrich). Se determinó el área por mm² de hueso trabecular (500 µm por debajo del cartílago de crecimiento) y cortical del fémur distal. El número de osteoclastos se dividió por el área ósea (trabecular o cortical) para obtener la densidad de osteoclastos. El área de hueso cortical y trabecular y el número de células multinucleadas teñidas con TRAP se cuantificaron con el software de análisis Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

6.4.5 Evaluación de la vasculatura del pannus

6.4.5.1 Inmunohistoquímica para vasos sanguíneos

La densidad vascular del pannus se analizó mediante inmunohistoquímica contra un marcador específico de endotelio (CD31). Las secciones de parafina de 3 µm de grosor se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 durante 8 minutos a temperatura ambiente; a continuación, los tejidos se sometieron a una recuperación de antígenos con buffer de Tris/EDTA (10mM Tris-Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9) durante 1 minuto a 95-100 °C. Las secciones se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-CD31 (1:2000, catálogo ab28364, Abcam, Cambridge, UK) por 12 horas a 4°C y posteriormente con el anticuerpo secundario biotinilado (1:2000, Vectastain Elite ABC kit, catálogo # PK-6101, Vector Laboratories) durante 2 horas seguido del reactivo ABS (Vectastain Elite ABC kit, catálogo # PK-6101, Vector Laboratories) por 30 minutos. La reacción se reveló adicionando el sustrato DAB (DAB Substrate Kit, catálogo #SK-4100, Vector Laboratories), y se contratiñó con hematoxilina de Weigert. La densidad de la red vascular se determinó a través de cuantificar el área positiva para CD31 con respecto al área total de la membrana sinovial o el pannus. Se cuantificó el número de vasos cuyo tamaño de lumen fuera ≥ 10 µm mediante el software Image-Pro-Plus.

6.4.5.2 Ensayo de azul de Evans

Para evaluar cambios en la vasopermeabilidad de la articulación se inyectó el trazador azul de Evans (45 mg/kg, Sigma-Aldrich) en la vena de la cola de los ratones. Dos horas después se obtuvieron 500µl de sangre del corazón para determinar la concentración de azul de Evans en el plasma y seguido de ello los animales se perfundieron con PBS pH 3.5 a 37°C para eliminar el colorante del torrente circulatorio. Se obtuvieron las membranas sinoviales y se extrajo el complejo albumina-colorante extravasado mediante la

incubación con 250µl de formamida (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ) durante 72 horas a 72°C. El extracto se centrifugó a 300,000g durante una hora y se cuantificó el colorante presente en el sobrenadante midiendo su absorbancia a 620 nm. La concentración del trazador en los extractos se calculó a partir de una curva estándar de azul de Evans en formamida y se normalizó con respecto al peso de la membrana sinovial y a la concentración del trazador en el plasma.

6.4.6 Generación de vasoinhibina bajo condiciones de inflamación

6.4.6.1 Inmunoprecipitación de vasoinhibina en suero

Para evaluar si la producción de vasoinhibina aumenta bajo condiciones de inflamación, se procedió a inmunoprecipitarla del suero de ratones silvestres (*Prlr*^{+/+}) y nulos (*Prlr*^{-/-}) para el receptor de la PRL. Los ratones *Prlr*^{-/-} son hiperprolactinémicos por la ausencia del asa de retroalimentación negativa que presentan (Schuff et al., 2002). Debido al límite de detección tan bajo proporcionado por las técnicas actuales para visualizar la vasoinhibina (inmunoprecipitación/Western blot), los altos niveles de PRL circulante en los ratones *Prlr*^{-/-} permitieron incrementar la posibilidad de encontrar su metabolito (vasoinhibina) en la circulación y determinar si éste se generaba más en condiciones de inflamación (modelo de AIA e inyección intraarticular con citocinas proinflamatorias). Brevemente, se procedió a inmunoprecipitar 100 µl de suero de ratones *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-} controles, bajo el modelo de AIA o inyectados intraarticularmente con citocinas proinflamatorias (62.5ng de TNF α , 25ng de IL-1 β , y 25ng de IFN γ). Los ratones sanos o inyectados con 10 µL de agua sin endotoxinas en la articulación de la rodilla sirvieron como controles. A los 100 µl de suero se les adicionaron 2 µl de antisuero anti-PRL C4 y NET-gel (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris base, 0.1% Igepal CA-630, 0.25% gelatina de piel de bovino, 0.02% azida de sodio, pH8) a un volumen final de 500 µl y se incubaron toda la noche seguida de una incubación de 2 hrs con proteína-A sefarosa (Sigma Aldrich, St Louis, MO) y posteriormente se centrifugaron (10 000 rpm/ 5 min/ 4°C) y lavaron con NET-gel, NET-gel con 10% de SDS y finalmente con 5 mM Tris base, 1% Nonidet P-40 a pH8. Por último, se retiró casi por completo el sobrenadante (dejando un remanente de 25 µl) y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y finalmente se realizó un Western blot. Los blots se bloquearon con 5% de leche y se incubaron toda la noche con el anticuerpo contra PRL [antisuero anti-PRL C4] en una dilución de 1:500. La detección se realizó con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

6.4.6.2 Corte de PRL con lisado articular

La actividad de las proteasas capaces de generar los distintos fragmentos de la vasoinhibina a partir de la PRL se determinó en la articulación de ratones sanos o bajo el modelo de AIA grave mediante la incubación de 200 ng de PRL de rata con 1 µg de lisado articular en buffer de incubación a pH neutro (0.05 M Tris-HCL, 0.15M NaCl y 0.01M CaCl, pH 7.0) o 0.02 µg de lisado articular a pH ácido (buffer de citratos con 0.15M de NaCl, pH 5) en un volumen final de 20 µl por 24 horas a 37°C. En experimentos separados, antes de adicionar la PRL de rata, los lisados articulares fueron inactivados por calor a 95°C por 15 min o preincubados por 30 min a 37°C con un inhibidor selectivo de MMP (1,10-fenantrolina [Gibco, Grand Island, NY]) o con un inhibidor selectivo de catepsina D (pepstatina A [Gibco, Grand Island, NY]). Después de las 24 h la reacción se paró a través de adicionar buffer Laemmli en condiciones reductoras y no reductoras e incubarlo en agitación 10 min a 95°C. Los productos del corte de la PRL se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y Western blot. Se utilizó una cámara de transferencia semiseca y los blots se bloquearon con 5% de leche y se incubaron toda la noche con el anticuerpo contra PRL [antisuero anti-PRL C1] en una dilución de 1:500. La detección se realizó con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

6.4.7 Aislamiento y cultivo de sinoviocitos tipo fibroblasto (STF)

Los STF se aislaron y cultivaron según el método establecido (Hardy et al., 2013) mediante la extracción de la articulación fémur/fíbula/tibia. La articulación se lavó en solución salina balanceada de Hank con antibióticos (0.125 mg/mL de gentamicina [Gibco, Grand Island, NY]) y antifúngicos (0.625 µg/mL de anfotericina B [Gibco, Grand Island, NY]) y se diseccionó removiendo todo el tejido blando (piel, tendón y músculo) teniendo la precaución de no romper el hueso para evitar una contaminación por células de la médula ósea. La membrana sinovial se expuso a través de retirar el tendón rotuliano y la rótula y se incubó en medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco, Grand Island, NY) y 1% de penicilina / estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA) al cual se le adicionó 1 mg/ml de colagenasa tipo IV y 0.1 mg/ml de desoxirribonucleasa 1 y se incubaron en agitación (300rpm) por 3 horas a 37°C. El tejido se agitó vigorosamente y el sobrenadante se filtró por una malla de 80 µm, se centrifugó a 1200 rpm por 10 min y el paquete celular se resuspendió en medio de cultivo fresco y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ hasta llegar a confluencia. Los STF fueron utilizados para los experimentos en los pasajes 3 o 4. Se sembraron 10⁶ células/pozo en placas

de 6 pozos en 1 mL de DMEM con 1% de suero fetal bobino con o sin vasoinhibina (50-200 nM) por 24 horas.

6.4.8 Determinación de la vía de señalización

6.4.8.1 Producción de óxido nítrico

La determinación indirecta de óxido nítrico (NO) mediante sus productos de oxidación estables (NO₂-y NO₃-) se realizó en los medios condicionados de los cultivos de STF tratados con vasoinhibina por 24 h. Las muestras se incubaron con la enzima nitrato reductasa de *E. coli* (catálogo #N0519, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en una solución de HEPES/formato (HEPES 1 M, pH 7.5; formato de amonio 2.4 M, pH 7.2) y se incubaron 1h a 37°C para convertir el NO₃- de las muestras en NO₂-. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se incubó con el reactivo de Griess (sulfanilamida al 1% y dihidrocloruro de naftilendiamina al 0.1% en ácido fosfórico al 5%) para determinar el NO₂- total midiendo las absorbancias de las muestras a 490 nm. Las concentraciones de nitrito y nitrato en las muestras se normalizaron con la proteína total de los STF sembrados a través del método de Bradford. La solución estándar de NaNO₃ se preparó en el medio de cultivo fresco utilizado para las incubaciones de los STF.

6.4.8.2 Traslocación nuclear de NFκB

Los STF se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles (5 x 10⁴ células por pozo) y se incubaron en ausencia o presencia de vasoinhibina (100 nM) durante 1 h. A continuación, las células se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 20 minutos, se lavaron y se incubaron en una solución de bloqueo (1% de BSA, suero normal de cabra al 5%, 0.05% de Triton X-100 en PBS) durante 1 h a RT, seguido de una incubación de 12 horas a 4°C con el anticuerpo anti-subunidad NF-κB p65 (1:1000, Catálogo #SC-109, Santa Cruz Biotechnology, CA, US). Las preparaciones se tiñeron con el anticuerpo secundario de Alexa Fluor 488 (1:500, Catálogo # ab150077, Abcam) a temperatura ambiente durante 2 h, se montaron en un portaobjetos y se sellaron. Las imágenes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (IX51, Olympus, Shinjuku, Japón).

6.4.8.3 Western Blot

Los STF o las articulaciones pulverizadas se resuspendieron en buffer de lisis (50mM de Tris Base, 150mM de NaCl, 0.5% de Igepal, 0.1% de SDS, pH 7.5) con 1/100 (v/v) de un cóctel de inhibidores de proteasa

(catálogo #P8340; Sigma-Aldrich). La proteína total (60 µg) se sometió a SDS/PAGE en condiciones reductoras, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en un cámara de transferencia semiseca, se bloquearon con 5% de leche y se incubaron 12 h a 4°C con anti-IkB-α (1:500, Catálogo # Sc-847; Santa Cruz Biotechnology), anti-IkB-β (1:500, Catálogo # Sc-945; Santa Cruz Biotechnology), anti-iNOS (1:250, Catálogo # ABN26; Sigma Aldrich, St. Louis, MO), anti-p-eNOS Ser1179 (1:500, Catálogo #9572; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) o anti-eNOS (1:500, Catálogo #9572; Cell Signaling) y anti-β-tubulina (1:1000, Catálogo # ab6046, Abcam). Las membranas se lavaron con Tris/Tween-20 y para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (1:5000, Catálogo #111-055-003; Jackson ImmunoResearch) o peroxidasa de rábano picante (1:5000; Catálogo #711-035-152; Jackson ImmunoResearch). Se utilizó el software Image J (Bio-Rad, Richmond, CA, US.) para evaluar los valores de densidad óptica.

6.4.9 Análisis de la expresión de mediadores inflamatorios

6.4.9.1 Extracción de RNA

Las articulaciones de la rodilla extraídas se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C. Posteriormente, se pulverizaron en mortero con pistilo, adicionando nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Para extraer el RNA se adicionó 1 mL de trizol (Invitrogen, Grand Island, NY) a cada 100 mg de tejido pulverizado, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente durante 5 min para disociar los complejos nucleoprotéicos. Después, se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de trizol adicionado, la mezcla se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C, formándose tres fases, el RNA que se encuentra soluble en la fase superior que corresponde a la fase acuosa, se recuperó e inmediatamente se le agregaron 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 12, 000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se decantó la mezcla teniendo cuidado de no eliminar el precipitado y se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% por cada mL de trizol y se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min. Se eliminó el etanol y el precipitado se diluyó con 20 µL de agua libre de nucleasas. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.4.9.2 Síntesis de cDNA

Se sintetizó el cDNA a partir del RNA extraído según las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), agregando la enzima transcriptasa reversa, deoxinucleótidos, los

oligonucleótidos y agua libre de nucleasas y se incubó 2 h a 37 °C. El cDNA se diluyó con agua libre de nucleasas hasta obtener una concentración de 10ng/μl y se almacenó a 4°C.

6.4.9.3 qPCR

Para determinar la expresión de los genes se realizó la PCR en tiempo real la cual consiste en preparar una mezcla de reacción agregando la Máxima® SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Auburn, USA), los oligonucleótidos (Tabla 1) y el cDNA con volumen final de la reacción de 10 μl. El nivel de expresión de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se normalizó a la expresión del gen constitutivo hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*Hprt*).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de genes de inflamación y angiogénesis mediante qPCR.

Gen	Secuencia (5'-3')		Temperatura de alineamiento (°C)
<i>Hprt</i>	Fw-TTGCTGACCTGCTGGATTAC	Rv-GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2
<i>Il1b</i>	Fw-GTTGATTCAAGGGGACATTA	Rv-AGCTTCAATGAAAGACCTCA	60.2
<i>Il6</i>	Fw-GAGGATACCACTCCCAACAGACC	Rv-AAGTGCATCATCGTTGTCATACA	60.2
<i>Icam1</i>	Fw-GCTGGGATTACCTCAAGAA	Rv-TGGGGACACCTTTTAGCATC	58.4
<i>Inos</i>	Fw-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	Rv-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	60.2
<i>Mmp3</i>	Fw-ATGCTGTCTTTGAAGCATTT	Rv-GCACTTCTTTTACAAAGAC	60.2
<i>Cxcl1</i>	Fw-GCTGGGATTACCTCAAGAA	Rv-TGGGGACACCTTTTAGCATC	58.4
<i>Cxcl2</i>	Fw-AAGTTTGCCTTGACCCTGAA	Rv-AGGCACATCAGGTACGATCC	58.4
<i>Cxcl3</i>	Fw-CTGCACCCAGACAGAAGTCA	Rv-GGACTTGCCGCTCTTCAGTA	58.4
<i>Ccl2</i>	Fw-AGCACCAGCCAACCTCTACT	Rv-CGTTAACTGCATCTGGCTGA	58.4
<i>Pecam1</i>	Fw-ATGACCCAGCAACATTCACA	Rv-TCGACAGGATGGAAATCACA	60.2
<i>Vegf</i>	Fw-CGCGAGTCTGTGTTTTGCA	Rv-CAGAGCGGAGAAAGCATTGT	53.7
<i>Vegfr2</i>	Fw-GCCCTGCCTGTGGTCTCACTAC	Rv-CAAAGCATTGCCCATTCGAT	61.2
<i>Hif1a</i>	Fw-ACAAGTACCACAGGACAG	Rv-AGGGAGAAAATCAAGTCG	61.2

Hprt, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; *Il1b*, Interleucina 1β; *Il6*, Interleucina 6; *Icam1*, molécula de adhesión intercelular 1; *Inos*, sintetasa de óxido nítrico inducible; *Mmp3*, Metaloproteasa de matriz 3; *Cxcl1*, ligando 1 de la quimiocina motivo C-X-C; *Cxcl2*, ligando 2 de la quimiocina motivo C-X-C; *Cxcl3*, ligando 3 de la quimiocina motivo C-X-C; *Ccl2*, ligando 2 de la quimiocina motivo C-C; *Pecam1*, molécula endotelial de adhesión a plaquetas; *Vegf*, factor de crecimiento endotelial vascular; *Vegfr2*, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular; *Hif1a*, subunidad alfa del factor inducido por hipoxia.

6.4.10 Análisis estadístico

Las comparaciones entre 2 grupos se evaluaron mediante la prueba de t de student y entre 3 o más grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc Tukey. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$. El tamaño de la muestra se indica en cada una de las figuras.

7 RESULTADOS

7.1 La terapia génica con vaso inhibina tiene efectos opuestos en función de la gravedad de la artritis inducida por antígeno (AIA)

Para investigar los efectos de la vaso inhibina, se indujo su sobreexpresión mediante vectores recombinantes AAV2-Vi en las articulaciones femoro-tibiales de ratones sanos (control) o bajo el modelo de artritis inducida por una dosis alta (AIA grave) o baja (AIA leve) de antígeno (Figura 3A). Cuatro semanas después de la inyección intraarticular de los vectores virales (AAV2-Vi y AAV2-null) se examinó la expresión del transgén mediante qRT-PCR. El transcrito de vaso inhibina humana se expresó en las articulaciones tratadas con el vector de vaso inhibina (AAV2-Vi) pero no en las tratadas con el vector nulo (AAV2-null) (Figura 3B), lo que confirma que los oligonucleótidos utilizados no amplifican la PRL endógena de ratón. La expresión del transgén de la vaso inhibina fue mayor en las articulaciones no artríticas y en las articulaciones con artritis leve (Figura 3B). Esto no es inesperado debido a que el genoma del vector AAV2 se mantiene en forma episomal sin integrarse en el genoma del huésped y, por tanto, es sensible a la dilución vía división celular e infiltración de células inmunes exacerbada en las condiciones inflamatorias más graves.

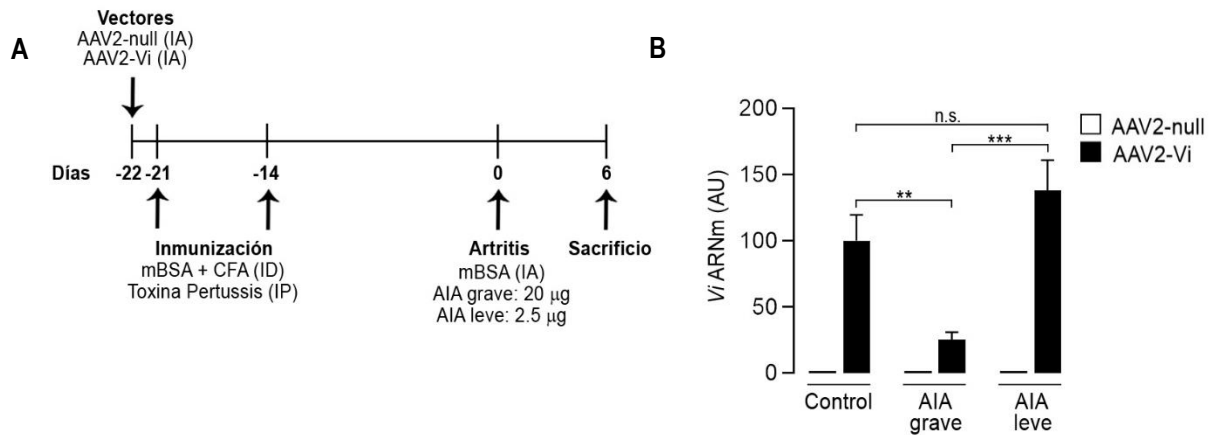
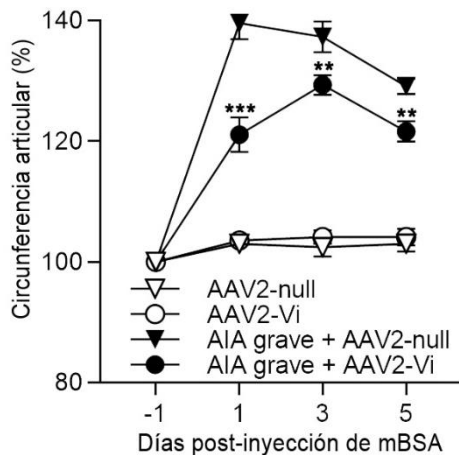


Figura 3. El vector AAV2 de vaso inhibina (AAV2-Vi) transduce la vaso inhibina. (A) Esquema del diseño experimental empleado en los ratones con artritis inducida por antígeno (AIA) inyectados con los vectores AAV2. Un día antes de iniciar el modelo de AIA (día -22) los ratones fueron inyectados intraarticularmente (IA) con el vector de vaso inhibina (AAV2-Vi) o el vector nulo (AAV2-null). Para iniciar el modelo de AIA, los ratones fueron inmunizados intradérmicamente (ID) 21 y 14 días antes de la inducción

de la artritis (día -21 y -14) con una mezcla del antígeno albúmina de suero bovino metilada (mBSA) y el adyuvante completo de Freund (CFA), además de una inyección intraperitoneal (IP) de la toxina pertussis. La inducción de la artritis grave y leve se realizó el día 0 mediante la inyección intraarticular (IA) en la rodilla de 20 o 2.5 μ g de mBSA, respectivamente. Los animales se sacrificaron por decapitación 6 días después de la inducción de artritis. **(B)** Nivel de expresión del ARNm de la vasoinhibina determinado por qRT-PCR en la rodilla de ratones sanos (control) o bajo el modelo de artritis inducida por antígeno grave (AIA grave) o leve (AIA leve) cuatro semanas después de haber sido inyectados intraarticularmente con el vector de vasoinhibina (AAV2-Vi) o el vector nulo (AAV2-null). Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 4-9 rodillas por grupo. n.s., no significativo; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La inyección de los AAV2-Vi redujo la inflamación de la articulación a juzgar por la menor circunferencia en animales con AIA grave en relación con los animales inyectados con el vector nulo que no tienen el transgén de la vasoinhibina (AAV2-null) (Figura 4A). Sin embargo, en el modelo con AIA leve, el vector AAV2-Vi incrementó la inflamación articular (Figura 4B). Los AAV2-Vi no modificaron la inflamación en ausencia de artritis (Figura 4A y B).

A



B

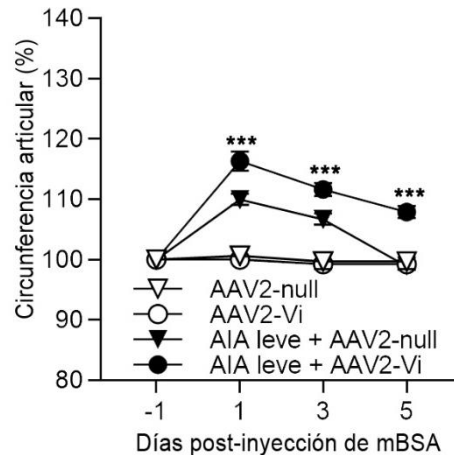


Figura 4. La sobreexpresión de vasoinhibina (Vi) mediante la inyección intraarticular de AAV2-Vi reduce la circunferencia de la articulación en el modelo de AIA grave y la incrementa en la AIA leve.

Se muestra el curso temporal de la inflamación de la rodilla, evaluada a través de su circunferencia determinada cada 2 días a partir de un día antes de la inyección intraarticular con **(A)** 20 μ g (AIA grave) o

(B) 2.5 μ g (AIA leve) del antígeno (albúmina bovina de suero metilada, mBSA). Los AAV2-Vi o el vector nulo (AAV2-null) se administraron 22 días antes de iniciar la AIA. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 8-10 rodillas por grupo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Las significancias son entre el grupo de AIA (grave o leve) + AAV2-Vi vs. AIA (grave o leve) + AAV2-null.

7.2 Efectos antiinflamatorios de la vasoinhibina en el modelo grave de artritis inducida por antígeno (AIA grave)

7.2.1 La terapia génica con vasoinhibina reduce el pannus y la pérdida de hueso en el modelo grave de AIA

El análisis histológico de la articulación de los ratones con AIA grave mostró una inflamación abundante caracterizada por un pannus profuso, degradación del cartílago articular y erosión del hueso subcondral en comparación con la articulación sana (control) (Figura 5A). El tratamiento con el AAV2-Vi disminuyó de manera significativa el área del pannus con respecto al área de la articulación (Figura 5B). Asimismo, se determinó una reducción en los núcleos celulares, v.gr. un menor número de células, en relación con la administración de los AAV2-null no codificantes. Con el propósito de evaluar la densidad celular, extrajimos las membranas sinoviales (rodillas sanas) o el pannus (rodillas artríticas) de nuevos grupos experimentales y cuantificamos la coloración nuclear revelada por hematoxilina-eosina (Figura 6A). Bajo condiciones libres de artritis (control), no se observaron cambios aparentes en la densidad celular con los dos tipos de vectores. La membrana se mantuvo conformada por pocas capas celulares en asociación con múltiples adipocitos (Figura 6A). Sin embargo, bajo la condición de AIA, fue claro que los AAV2-Vi se asociaron con una menor densidad celular que los AAV2-null (Figura 6A). Estas diferencias fueron significativas cuando se cuantificó la tinción azul por área como índice de la densidad celular (Figura 6B). La menor densidad celular pudiera reflejar una disminución en la infiltración de células inmunes. Lo anterior correlacionó con una reducción de la expresión de ICAM-1, molécula que media la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, lo cual sugiere una menor migración transendotelial bajo el tratamiento con AAV2-Vi en comparación con los AAV2-null (Figura 6C).

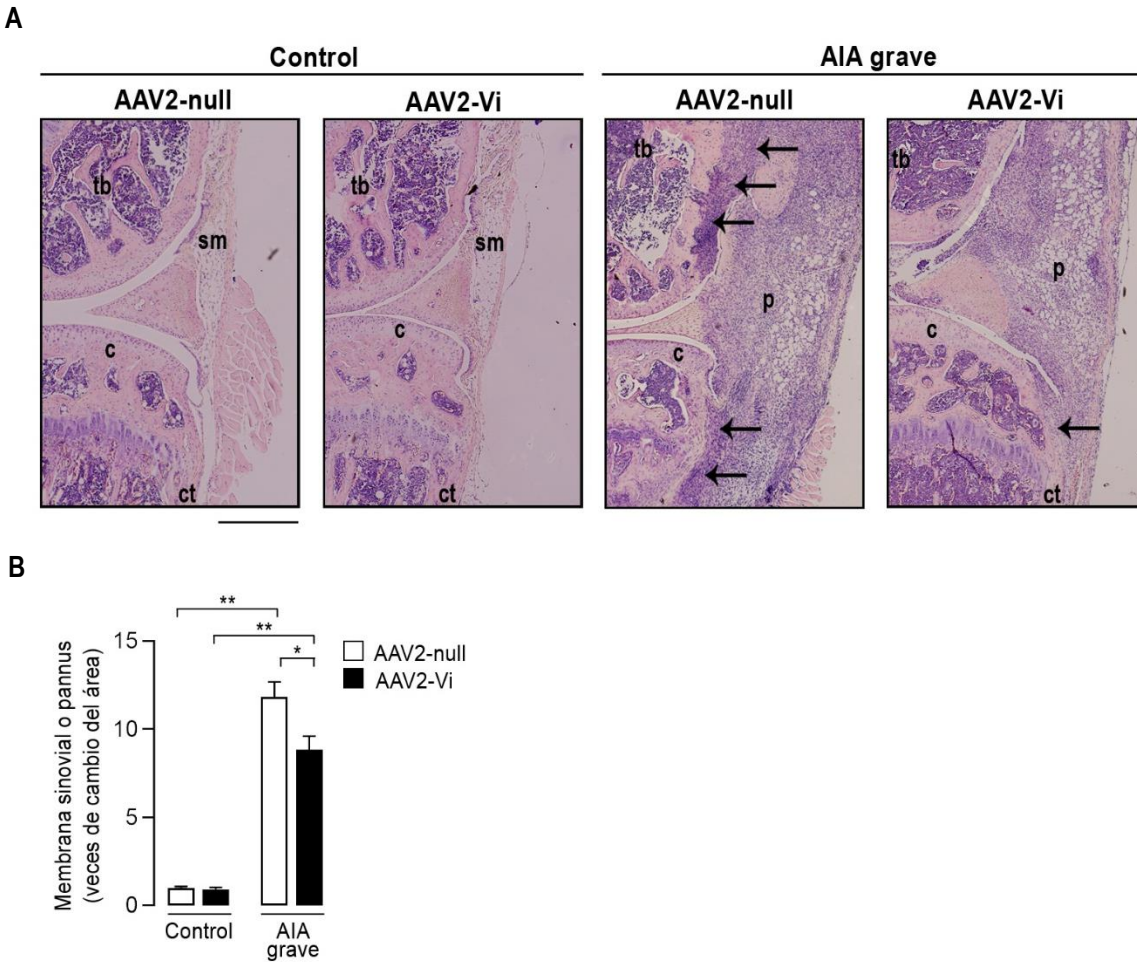


Figura 5. Los AAV2-Vi reducen el pannus en la articulación de ratones con AIA grave. (A) Secciones histológicas de la membrana sinovial de la articulación femoro-tibial teñidas con hematoxilina y eosina de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave), inyectados con AAV2-Vi o con el vector no codificante (AAV2-null). La invasión/degradación de cartílago y hueso se indica con las flechas. sm, membrana sinovial; c, cartílago; p, pannus; tb, trabécula; ct, hueso cortical. Barra 500µm. (B) La gráfica muestra las veces de cambio del área de la membrana sinovial (grupos controles) o pannus (grupos con AIA grave) con respecto al área total de la articulación. Los resultados muestran la media ± error estándar (EE) de 5-6 rodillas por grupo. **p<0.01; *p<0.05.

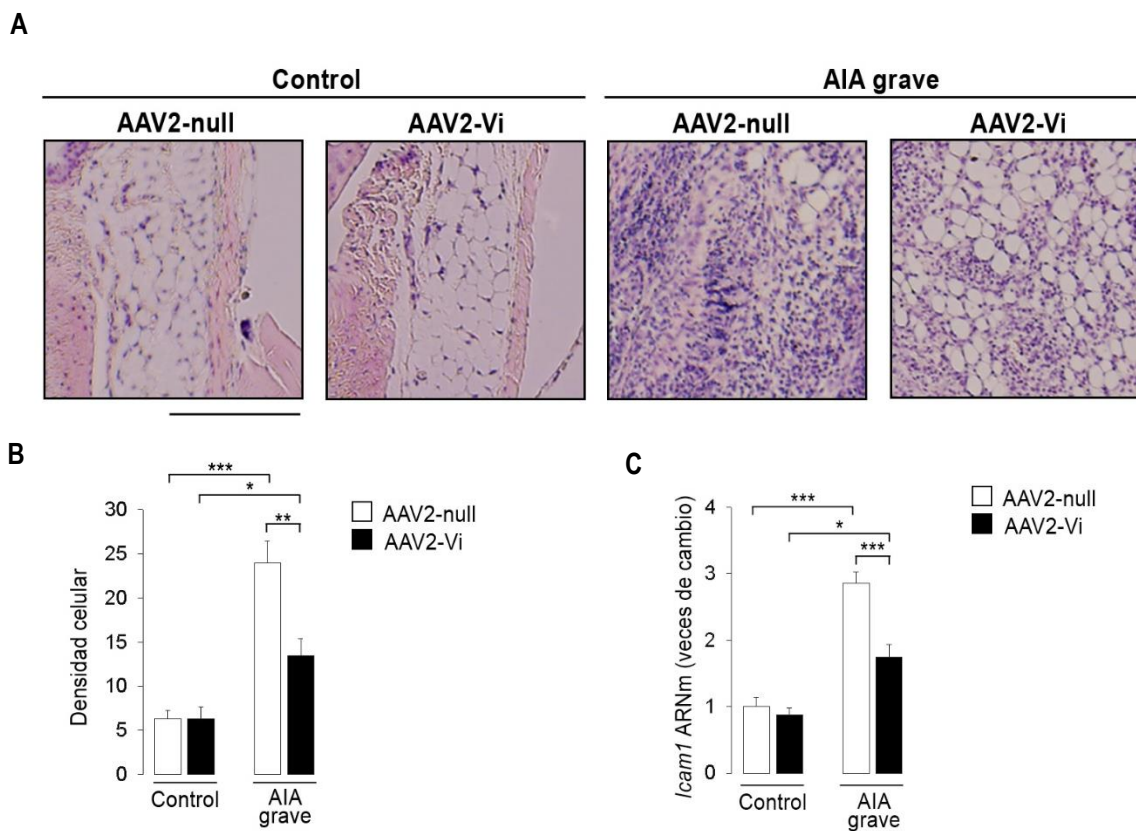


Figura 6. Los AAV2-Vi reducen la densidad celular del pannus en la articulación de ratones con AIA grave. (A) Secciones histológicas de la membrana sinovial y del pannus de la articulación femoro-tibial teñidas con hematoxilina y eosina de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi o con el vector no codificante (AAV2-null). Barra = 200µm. (B) La gráfica muestra la densidad celular (tinción de núcleos / mm²) de la membrana sinovial (grupos controles) y el pannus (grupos con AIA). (C) Expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en la articulación de la rodilla evaluada mediante qRT-PCR. Los resultados muestran la media ± error estándar (EE) de 4-6 rodillas por grupo. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Analizamos la pérdida del hueso en los ratones inyectados con el vector de AAV2-Vi o nulo (AAV2-null) en secciones del fémur distal mediante la cuantificación del área del hueso trabecular y cortical, así como la densidad de las células multinucleadas TRAP-positivas (osteoclastos) (Figura 7A). La articulación con AIA

grave que fue inyectada con el vector nulo (AAV2-null) mostró una reducción el área del hueso trabecular y cortical, así como un aumento en la densidad de osteoclastos (Figura 7B y C). El tratamiento con el vector de vasoinhibina (AAV2-Vi) previno la pérdida del hueso trabecular y cortical y redujo el incremento en la densidad de osteoclastos en la articulación artrítica (Figura 7B y C). Ninguno de los vectores modificó el área del hueso o la densidad de osteoclastos en los animales sanos.

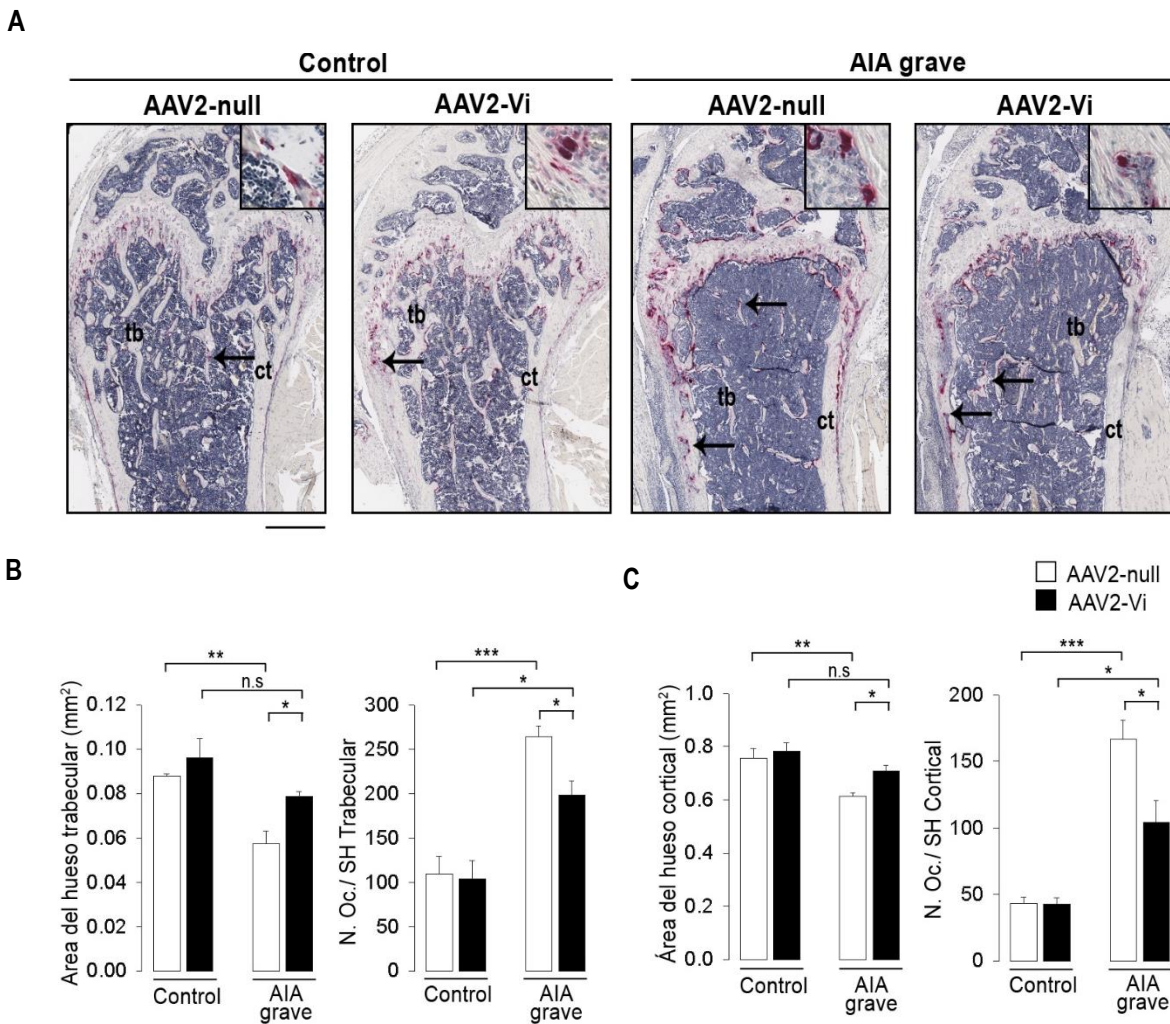


Figura 7. Los AAV2-Vi reducen la pérdida de hueso distal en la articulación de ratones con AIA grave.

(A) Micrografías representativas de secciones histológicas teñidas con fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) en donde las flechas muestran las células multinucleadas positivas para TRAP (osteoclastos) en el hueso trabecular y cortical de la articulación femorotibial de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi o con el vector no codificante (AAV2-null). Insertos: magnificación de un osteoclasto. tb, hueso trabecular; ct, hueso cortical. Barra: 500µm. Las

gráficas muestran el área y la densidad de osteoclastos normalizada por la superficie del hueso (SH) (B) trabecular y (C) cortical. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 3-5 rodillas por grupo. n.s., no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.2.2 La terapia génica con vasoinhibina reduce la expresión de marcadores vasculares en el pannus de ratones con AIA grave

El vector AAV2-Vi redujo la expresión génica del marcador vascular *Pecam-1* (el gen que codifica para CD31) (Figura 8A), de *Hif1a*, del *Vegf* y de su receptor tipo 2 (*Vegfr2*) (Figura 8B). Estos hallazgos son consistentes con una menor angiogénesis ya que se conoce que la expresión de HIF-1 α se incrementa en condiciones de hipoxia y este factor induce la expresión del VEGF, lo cual estimula la angiogénesis (Forsythe et al., 1996). También encontramos que el vector AAV2-Vi se asoció con la reducción de la expresión génica de las citocinas proinflamatorias con acciones proangiogénicas, *Il6* e *Il1b* (Figura 8C).

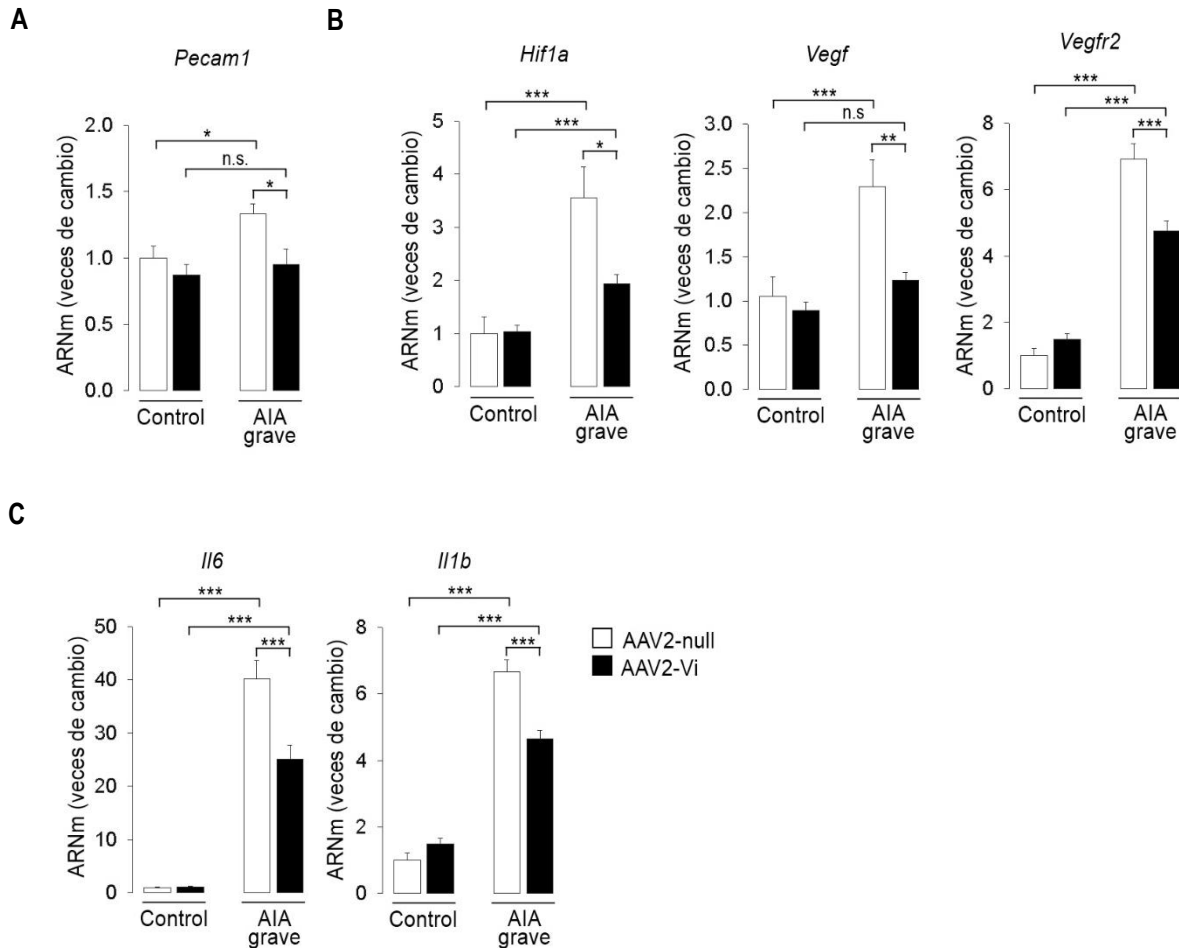


Figura 8. Los AAV2-Vi reducen la expresión de marcadores vasculares, angiogénicos y proinflamatorios en la articulación de ratones con AIA grave. Determinación mediante qRT-PCR de la expresión del gen vascular que codifica para (A) la molécula endotelial de adhesión a plaquetas o CD31 (*Pecam1*), (B) de los genes proangiogénicos que codifican para subunidad alfa del factor inducido por hipoxia (*Hif1a*), el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf*) y el receptor 2 del VEGF (*Vegfr2*), (C) así como de los genes proinflamatorios que codifican para la IL-6 (*Il6*) y la IL-1 β (*Il1b*) (C) en el tejido articular de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi o con el vector no codificante (AAV2-null). Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 4-5 rodillas por grupo. n.s., no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.2.3 La terapia génica con vasoinhibina reduce la densidad vascular en el pannus de ratones con AIA grave

Debido a que la reducción en la expresión de *Pecam1*, *Vegf*, *Vegfr2* y *Hif1a* sugiere la interrupción de la angiogénesis, evaluamos el efecto de los AAV2-Vi sobre la expresión de la proteína CD31, codificada por el gen *Pecam1*, la cual se expresa predominantemente en la superficie de las células endoteliales y se emplea para determinar la densidad vascular mediante inmunohistoquímica. La inyección intraarticular del AAV2-Vi se asoció con una reducción en la densidad vascular (área inmunoteñida contra CD31 / área de la membrana sinovial) y el número de vasos (número de vasos / mm² de la membrana sinovial) en el pannus de los ratones artríticos y no tuvo efecto sobre la vasculatura de la membrana sinovial de los ratones sanos (Figura 9A). Estos resultados se confirmaron con la evaluación del pannus extraído de la articulación artrítica, donde también observamos una reducción de la densidad vascular y el número de vasos por acción del tratamiento con el AAV2-Vi (Figura 9B).

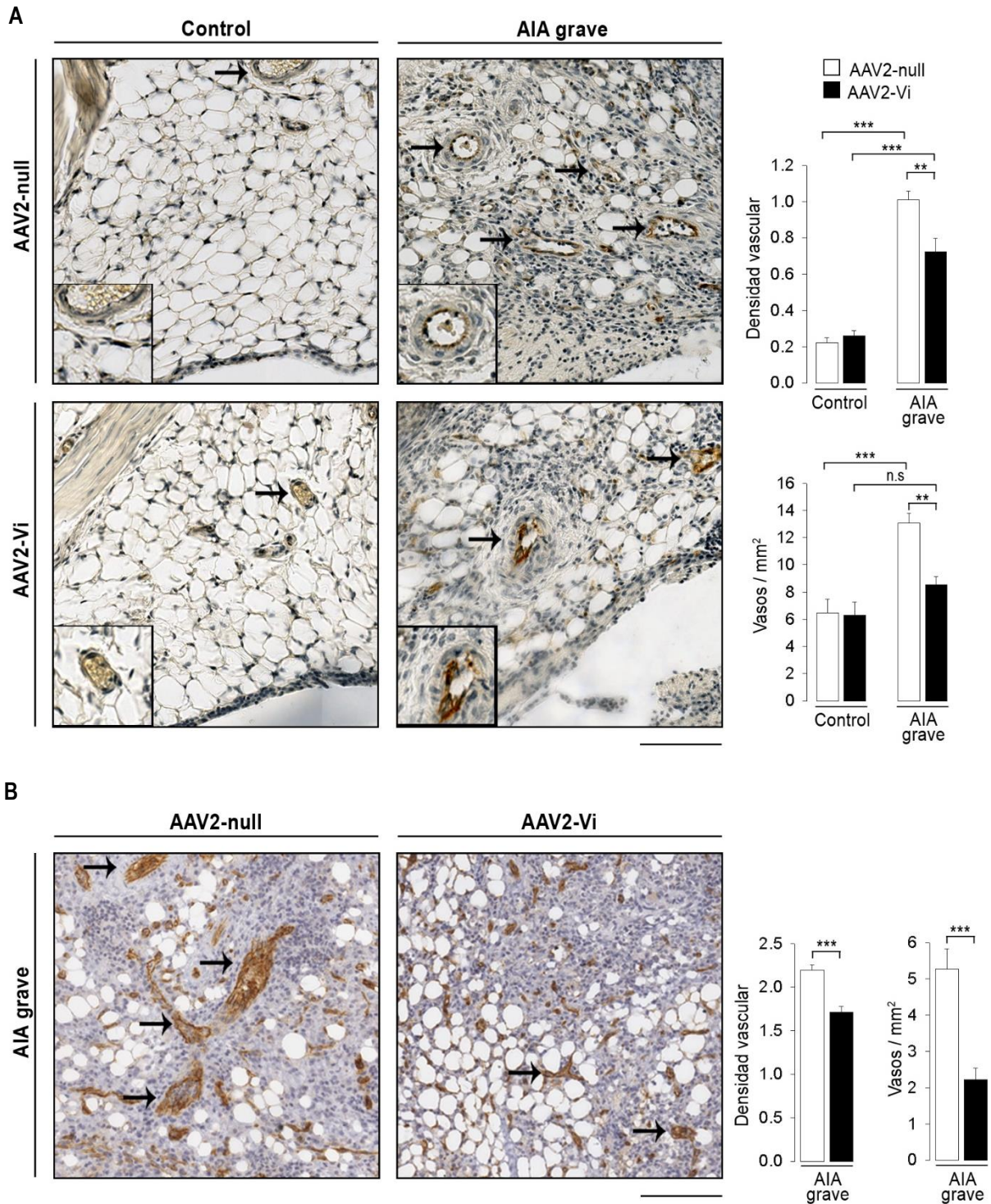


Figura 9. Los AAV2-Vi reducen la densidad vascular del pannus en la articulación de ratones con AIA grave. (A) Micrografías representativas que muestran la expresión del marcador de vasos CD31 (tinción en café) en una sección de la membrana sinovial de la articulación femoro-tibial de ratones en condiciones sanas (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi

o con el vector nulo (AAV2-null). (B) Micrografías representativas que muestran la expresión de CD31 (tinción en café) en una sección del pannus extraído de la articulación femoro-tibial de ratones con AIA grave inyectados con AAV2-Vi o con el vector nulo (AAV2-null). Los vasos se indican con las flechas. Barra 100µm. Las gráficas de densidad vascular en A y B muestran el área teñida por los vasos en relación con el área total de la membrana sinovial o pannus. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 5 membranas sinoviales o pannus por grupo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.2.4 La vasoinhibina reduce la permeabilidad vascular en la membrana sinovial de ratones con AIA grave

Para investigar si la terapia génica con vasoinhibina reduce la permeabilidad vascular en la articulación artrítica utilizamos el método de azul de Evans. Éste es un colorante que al ser inyectado en la circulación se une de forma irreversible a las proteínas séricas, entre las que sobresale por su abundancia la albúmina, por lo que la presencia del colorante en los tejidos de la articulación es un indicador de la extravasación de la albúmina y, por ende, de la permeabilidad vascular (Radu y Chernoff, 2013). El aumento en la vasopermeabilidad resulta en edema e hinchazón de la articulación artrítica. La sobreexpresión de vasoinhibina mediante los AAV2-Vi redujo significativamente la vasopermeabilidad en la membrana sinovial de los animales artríticos comparado con la de los animales tratados con los AAV2-null (Figura 10). Más aún, la inyección intraarticular a ratones sanos de VEGF, uno de los principales factores que promueven la permeabilidad vascular (Dvorak et al., 1995), incrementa la vasopermeabilidad en la membrana sinovial al cabo de 24 horas, efecto que no se observa cuando el VEGF es administrado conjuntamente con una preparación pura de vasoinhibina (Figura 11).

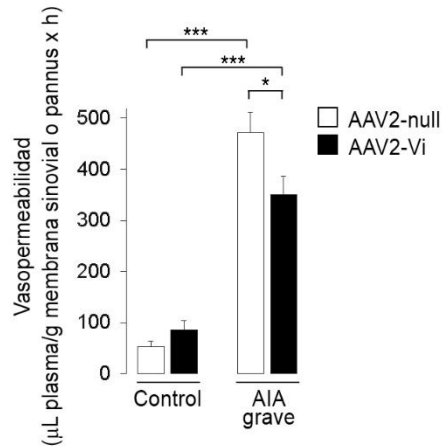


Figura 10. Los AAV2-Vi reducen la vasopermeabilidad del pannus en la articulación de ratones con AIA grave. La vasopermeabilidad de la membrana sinovial de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi o con el vector nulo (AAV2-null) fue evaluada a través de la cuantificación de la extravasación del colorante azul de Evans unido a la albúmina. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 6-7 membranas sinoviales o pannus por grupo. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

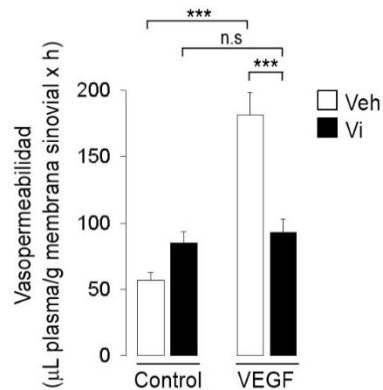


Figura 11. La vaso inhibina inhibe la vasopermeabilidad de la membrana sinovial inducida por el VEGF. La vasopermeabilidad de la membrana sinovial en ratones sanos se evaluó 24 horas después de una inyección intraarticular de VEGF, un estándar puro de vaso inhibina (Vi) o una combinación de ambos tratamientos a través de la cuantificación de la extravasación del colorante azul de Evans unido a la

albúmina. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 10-25 membranas sinoviales o pannus por grupo. n.s., no significativo; *** $p < 0.001$.

7.2.5 La terapia génica con vasoinhibina bloquea la fosforilación de eNOS en la Ser1179 inducida en la AIA grave

Previamente se determinó que la vasoinhibina inhibe la proliferación, dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos, inducida por el VEGF en la retinopatía diabética, a través de reducir la fosforilación/activación del residuo de Serina 1179 (Ser1179) de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (García et al., 2008; Garcia et al., 2014). Por ello, en este estudio se evaluó el efecto de la vasoinhibina mediante los AAV2-Vi en la AIA, encontrando que ésta también evita la fosforilación de eNOS en la Ser1179 inducida por la artritis (Figura 12).

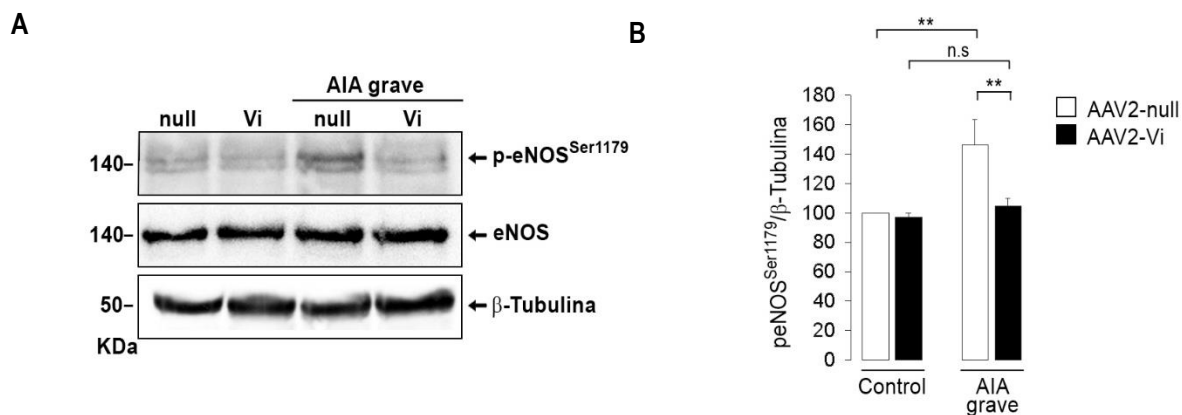


Figura 12. Los AAV2-Vi previene la fosforilación del residuo Ser1179 de eNOS en la AIA grave. (A) Análisis de un Western blot representativo de la eNOS-Ser1179 fosforilada en tejido articular de ratones sanos (control) o con artritis grave inducida por antígeno (AIA grave) inyectados con AAV2-Vi o con el vector nulo (AAV2-null). eNOS total y β -Tubulina se utilizaron como controles de carga. (B) Cuantificación por densitometría de la fosforilación de eNOS normalizada con β -Tubulina. Los resultados muestran la media \pm error estándar (EE) de 3-5 articulaciones por grupo. n.s., no significativo; ** $p < 0.01$.

7.3 Efectos proinflamatorios de la vasoinhibina en el modelo leve de artritis inducida por antígeno (AIA leve)

7.3.1 La terapia génica con vasoinhibina incrementó el pannus y la infiltración de células inmunes en el modelo de AIA leve

A diferencia de la AIA grave, la histología de las articulaciones artríticas de la AIA leve presentó un pannus menos abundante, sin aparente degradación del cartílago ni erosión del hueso subcondral (Figura 5 y 13). Además, no se determinó un incremento significativo en el área del pannus en los animales con AIA leve tratados con el vector nulo (AAV2-null) respecto a los animales sanos (control) (Figura 13). Por otro lado, el AV2-Vi indujo un incremento significativo en el área del pannus con respecto al grupo sano (control) inyectado con el mismo vector (Figura 12). Cabe resaltar que el modelo de AIA grave mostró un área del pannus 11 veces mayor que su condición sana; mientras que en el modelo de AIA leve el aumento fue solo 1.8 veces (Figura 5 y 13).

A pesar de no encontrar una diferencia significativa en el área del pannus en los ratones con AIA leve inyectados con el vector nulo (AAV2-null) y de acuerdo con el incremento en la densidad celular observado en la histología del tejido (Figura 13), la inmunohistoquímica mostró una abundante infiltración leucocitaria (células CD11b+) al compararla con la condición sana (control), la cual aumentó aún más cuando los ratones fueron inyectados con el vector de vasoinhibina (AAV2-Vi) (Figura 14). No se encontró infiltración leucocitaria en ausencia de artritis (Figura 14).

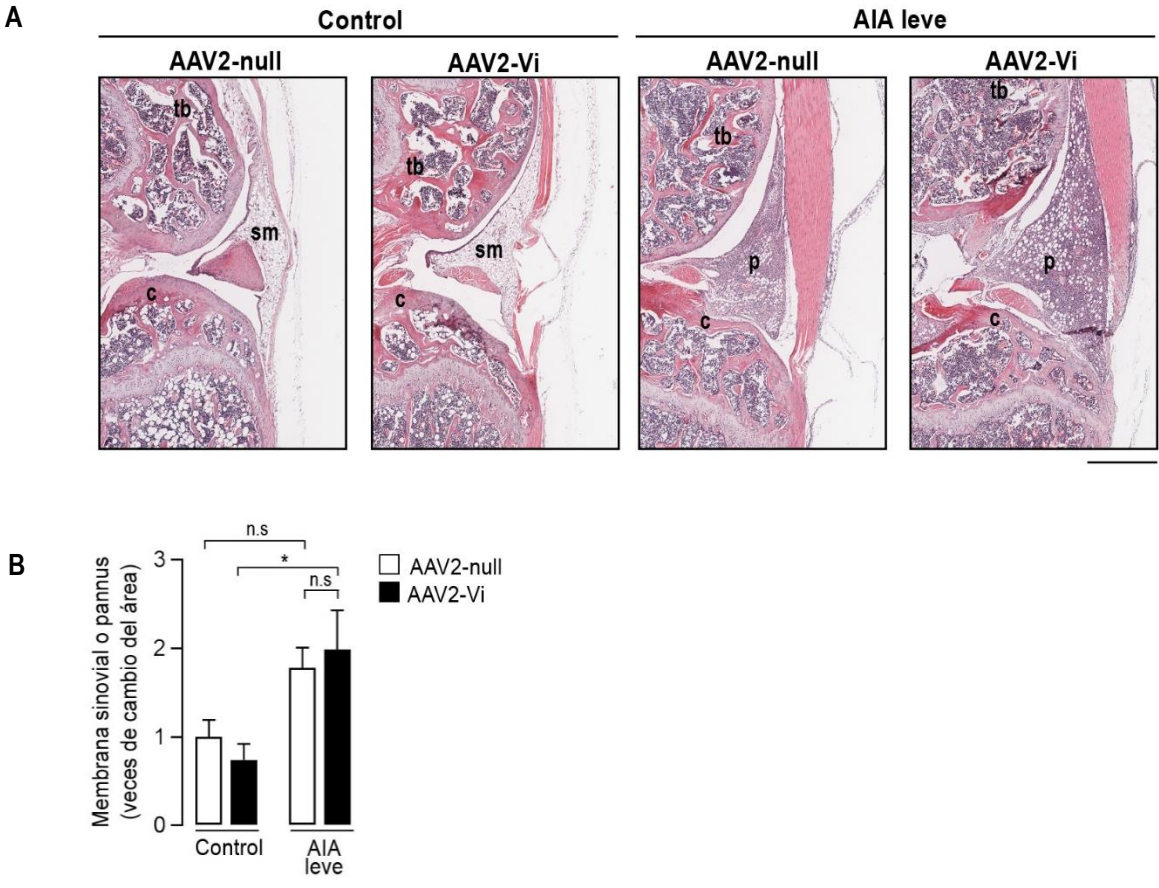


Figura 13. Los AAV2-Vi incrementan el pannus en la articulación de ratones con AIA leve. (A) Secciones histológicas de la membrana sinovial o pannus de la articulación femoro-tibial teñidos por hematoxilina y eosina de ratones sanos (control) o con artritis leve inducida por antígeno (AIA leve) inyectados con AAV2-Vi o con el vector no codificante (AAV2-null). sm, membrana sinovial; c, cartílago; p, *pannus*; tb, trabécula. Barra 500µm. **(B)** La gráfica muestra las veces de cambio del área de la membrana sinovial (grupos controles) o pannus (grupos con AIA leve) con respecto al área total de la articulación. Los resultados muestran la media ± error estándar (EE) de 4-6 rodillas por grupo. n.s., no significativo; *p<0.05.

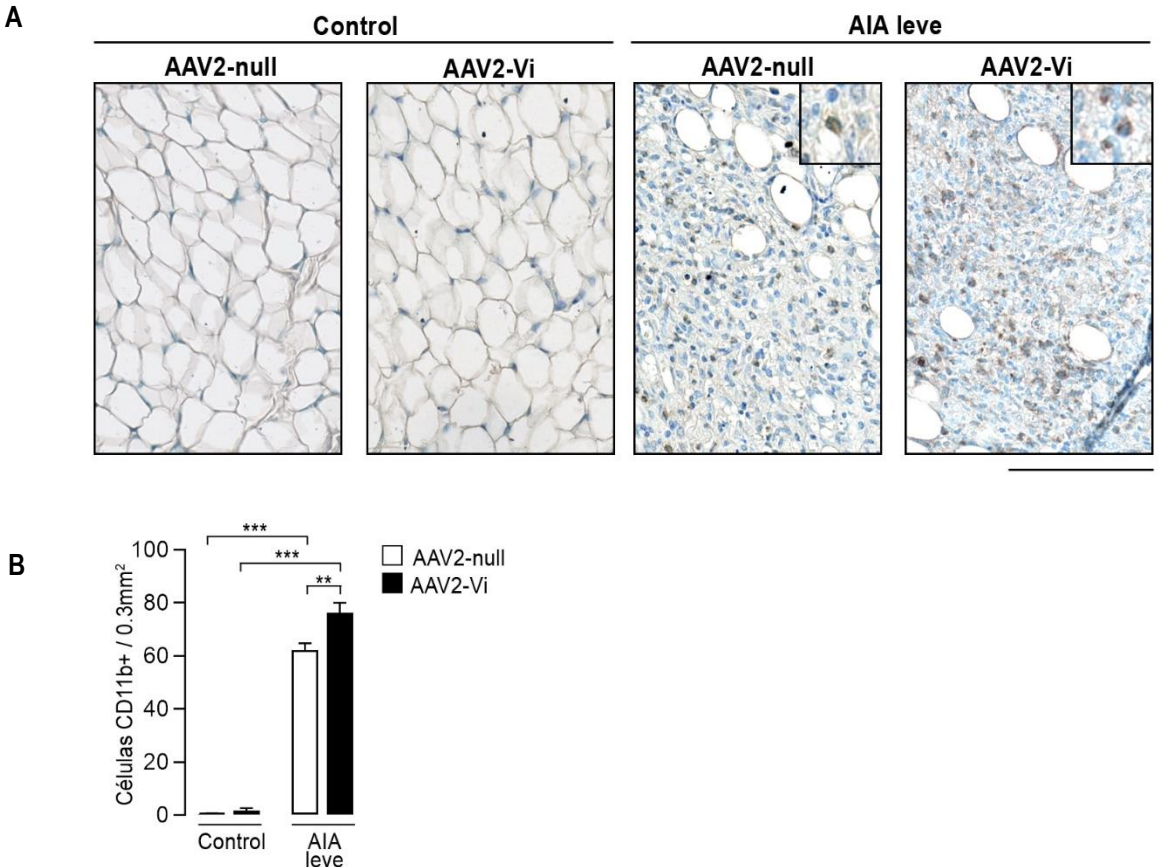


Figura 14. Los AAV2-Vi incrementan la infiltración leucocitaria en el pannus de la articulación de ratones con AIA leve. (A) Micrografías representativas que muestran la expresión del marcador de leucocitos CD11b (tinción en café) en una sección de la membrana sinovial de la articulación femoro-tibial de ratones sanos (control) o con artritis leve inducida por antígeno (AIA leve) inyectados con AAV2-Vi o con el vector nulo (AAV2-null). Insertos: magnificación de una célula CD11b positiva. Barra: 100 μ m. La gráfica muestra el número de células CD11b positivas en 0.3 mm² de tejido. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 4-7 animales por grupo. n.s., no significativo; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

7.3.2 La terapia génica con vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en el modelo de AIA leve

Las articulaciones de la rodilla de los ratones con AIA leve inyectados con el AAV2-Vi vs. el AAV2-null, presentaron un incremento en la expresión génica de citocinas proinflamatorias (*Il1b* e *Il6*; Figura 15A),

quimiocinas (*Cxcl1*, 2, 3 y la *Ccl2*; Figura 15C), *Inos*, y *Mmp3* (Figura 15A). Esta última participa de manera importante en la degradación de varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo las colágenas, en la AR (Ma et al., 2014).

Además, la terapia génica con vaso inhibina incrementó la expresión génica de *Icam1* en los ratones con artritis leve en comparación con la terapia con AAV2-null (Figura 15B) sugiriendo un incremento en la migración transendotelial (Muller, 2009).

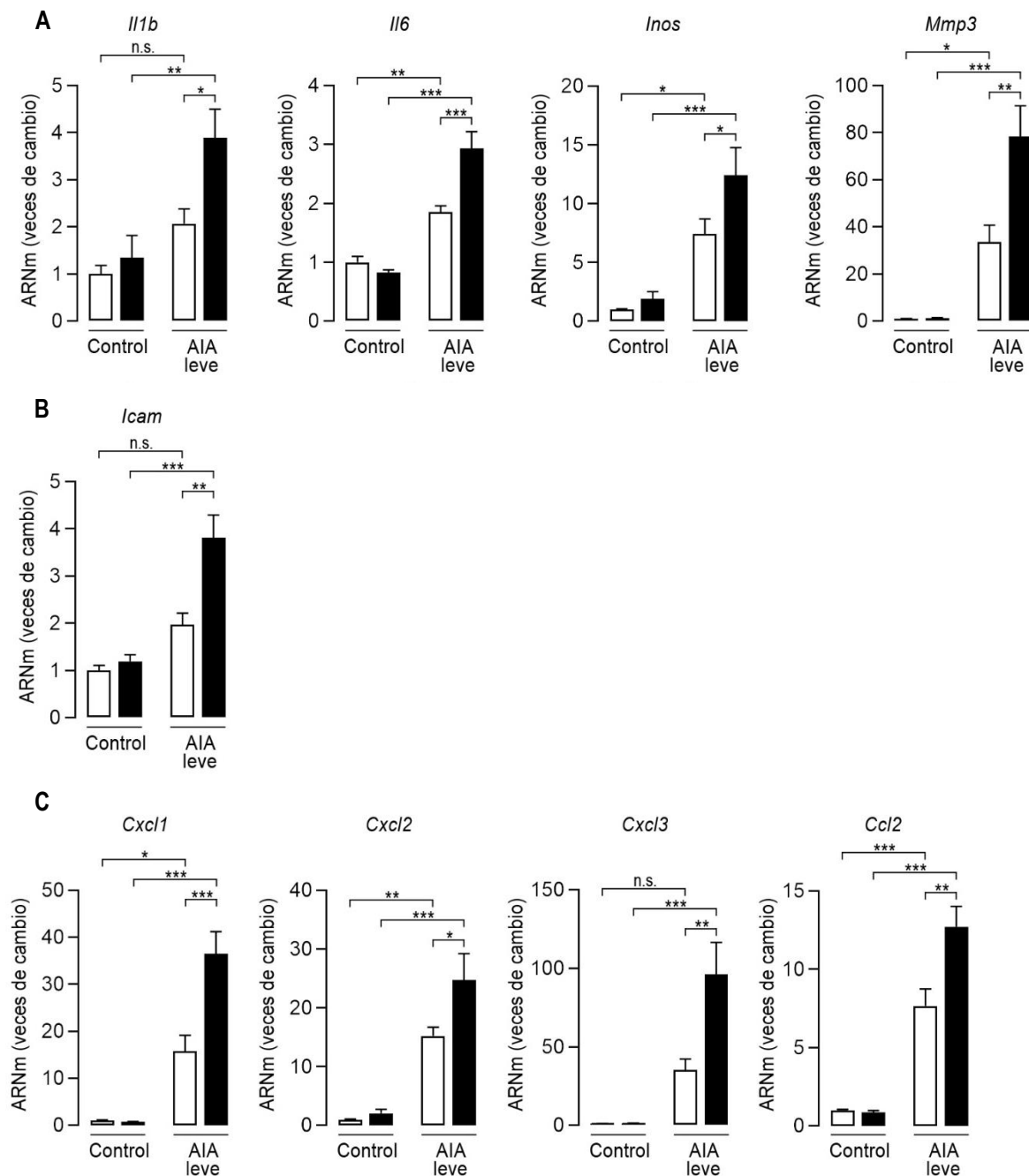


Figura 15. Los AAV2-Vi incrementan la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en la articulación de ratones con AIA leve. Determinación mediante qRT-PCR de la expresión de (A) los genes proinflamatorios que codifican para la interleucina 1 beta (*Il1b*), la interleucina 6 (*Il6*), la sintetasa de óxido nítrico inducible (*Inos*) y la metaloproteasa de matriz 3 (*Mmp3*); (B) la molécula de adhesión intercelular 1 (*Icam1*); (C) y las quimiocinas *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* y *Ccl2* en la articulación de

ratones sanos (control) o con artritis leve inducida por antígeno (AIA leve) inyectados con AAV2-Vi o con el vector nulo (AAV2-null). Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 4-7 animales por grupo. n.s., no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.3.3 La vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblasto

Evaluamos a los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) como posibles células blanco de las acciones proinflamatorias de la vasoinhibina debido a que tienen una participación muy importante en la patogénesis de la AR al producir citocinas, quimiocinas y proteasas que perpetúan la inflamación articular (Bartok y Firestein, 2010). El tratamiento por 24 horas con dosis crecientes de vasoinhibina (10, 50 y 100 nM) en un cultivo primario de STF incrementó de forma dosis dependiente la expresión génica de los mediadores proinflamatorios *Il1b*, *Il6*, *Inos* y *Mmp3* (Figura 16A) así como la expresión de las quimiocinas *Cxcl 1*, *2*, *3* y la *Ccl 2* (Figura 16B).

También se determinó un efecto dosis respuesta de la vasoinhibina en los STF sobre la producción de la proteína de iNOS y NO, evaluada por WB y por la determinación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), respectivamente (Figura 17A y B).

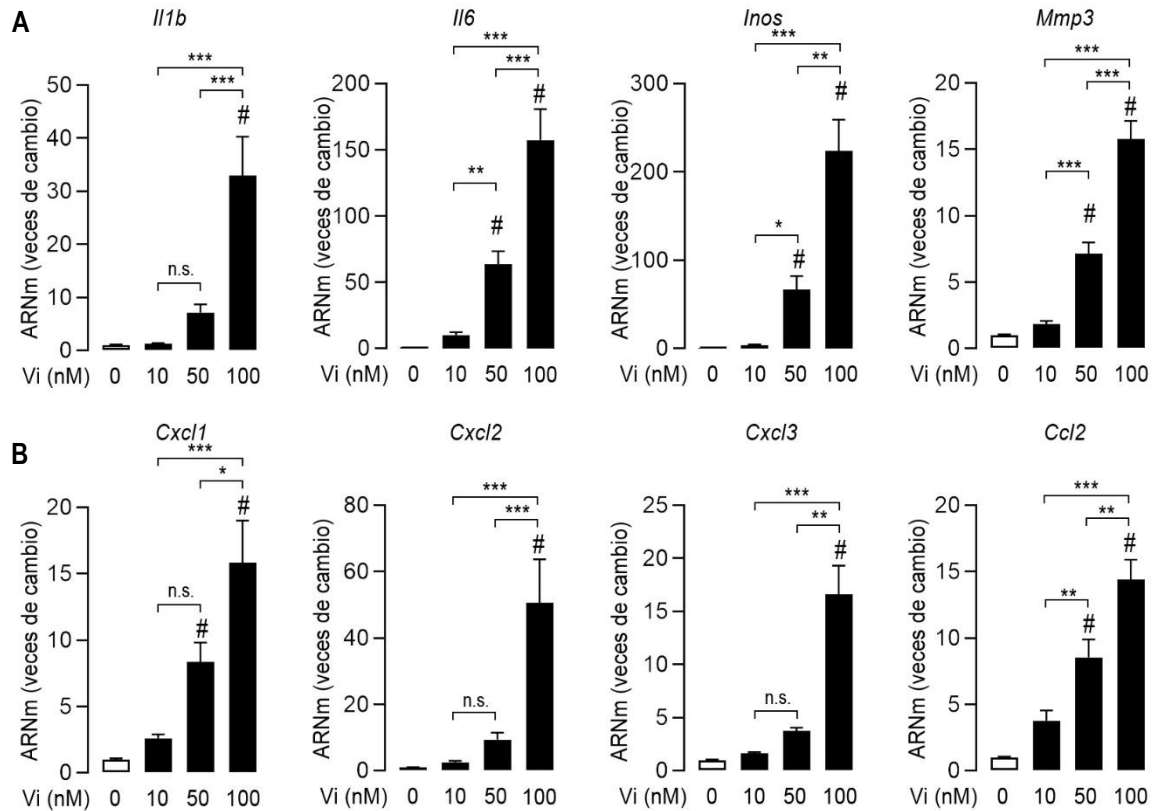


Figura 16. La vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas de forma dosis dependiente en sinoviocitos tipo fibroblastos (STF). Determinación mediante qRT-PCR de la expresión de los genes (A) proinflamatorios que codifican para la IL-1 β (*Il1b*), la IL-6 (*Il6*), la sintetasa de óxido nítrico inducible (*Inos*) y la metaloproteasa de matriz 3 (*Mmp3*); (B) y las quimiocinas *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* y *Ccl2* en STF tratados o no con dosis crecientes de vasoinhibina (10, 50 y 100 nM) por 24 h. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 3-4 cultivos independientes. # $p < 0.05$ vs. control. n.s., no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

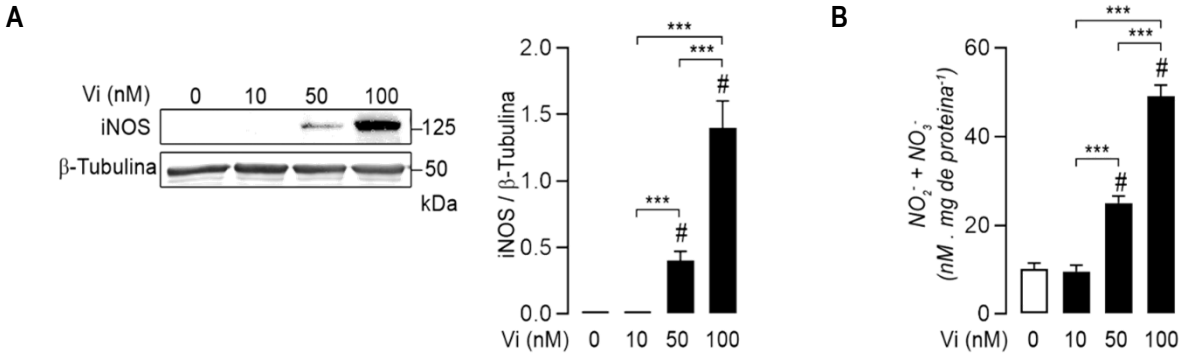


Figura 17. La vasoinhibina incrementa la generación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) de forma dosis dependiente en sinoviocitos tipo fibroblastos (STF). (A) Análisis por western blot de iNOS en lisados de STF tratados o no 24 h con dosis crecientes de vasoinhibina (10, 50 y 100 nM). Las barras muestran la cuantificación de iNOS/ β -tubulina por densitometría. (B) Producción de NO medida por la acumulación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) en el medio condicionado de STF tratados o no con dosis crecientes de vasoinhibina (10, 50 y 100 nM) por 24 h. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 3-4 cultivos independientes. # $p < 0.001$ vs. control. *** $p < 0.001$.

7.3.4 La vasoinhibina induce la expresión de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en los STF mediante la activación de NF- κ B

La vía del NF- κ B promueve la expresión de mediadores de inflamación en la AR (Tak y Firestein, 2001). Debido a que se ha reportado que la vasoinhibina induce esta vía en células endoteliales y fibroblastos de pulmón incrementando la expresión de la iNOS, en el presente trabajo evaluamos la posibilidad de que la vasoinhibina también induzca la expresión de los mediadores proinflamatorios y las quimiocinas en los STF a través de la vía de NF- κ B (Macotela et al., 2002; Tabruyn et al., 2007).

En primer lugar, para determinar si la vasoinhibina induce la vía de NF- κ B, se estudió la distribución celular de la subunidad p65 de NF- κ B en los STF a través de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-p65. En ausencia del tratamiento (control), p65 se encontró distribuida homogéneamente en el citoplasma y núcleo (Figura 18A). El tratamiento con 100 nM de vasoinhibina indujo la traslocación al núcleo de p65 (Figura 18A).

NF- κ B es inhibido de forma diferencial por la familia inhibidores de NF- κ B (I κ B) que consiste principalmente de I κ B- α e I κ B- β (Καρίν ψ Βεν-Νερίαη, 2000). De forma consistente, a través de evaluar mediante western blot la cinética de degradación de los I κ Bs, encontramos que el tratamiento con vasoinhibina induce la degradación gradual de I κ B- β que es máxima a los 180 min (Figura 18B). Por otro lado, el tratamiento de vasoinhibina no alteró los niveles de I κ B- α a los tiempos evaluados (Figura 18B).

Para investigar si el tratamiento con vasoinhibina induce la expresión de los mediadores proinflamatorios y quimiocinas a través de activar NF- κ B, tratamos los STF con BAY 11-7085 (BAY), un inhibidor de las I κ B quinasas (IKK), responsables de la fosforilación-degradación de los I κ B y por lo tanto un inhibidor de la vía de NF- κ B (Karin y Ben-Neriah, 2000). Encontramos que el tratamiento con BAY inhibe el incremento en la expresión del ARNm de los mediadores proinflamatorios (*Il1b*, *Il6*, *Inos* y *Mmp3*) (Figura 19A) y las quimiocinas (*Cxcl1*, 2, 3 y la *Ccl2*) (Figura 19B) así como la producción de la proteína de iNOS (Figura 20A) y el NO (Figura 20B) inducido por 100 nM de la vasoinhibina, lo cual indica que ésta media sus acciones proinflamatorias en los STF a través de activar la vía de NF- κ B.

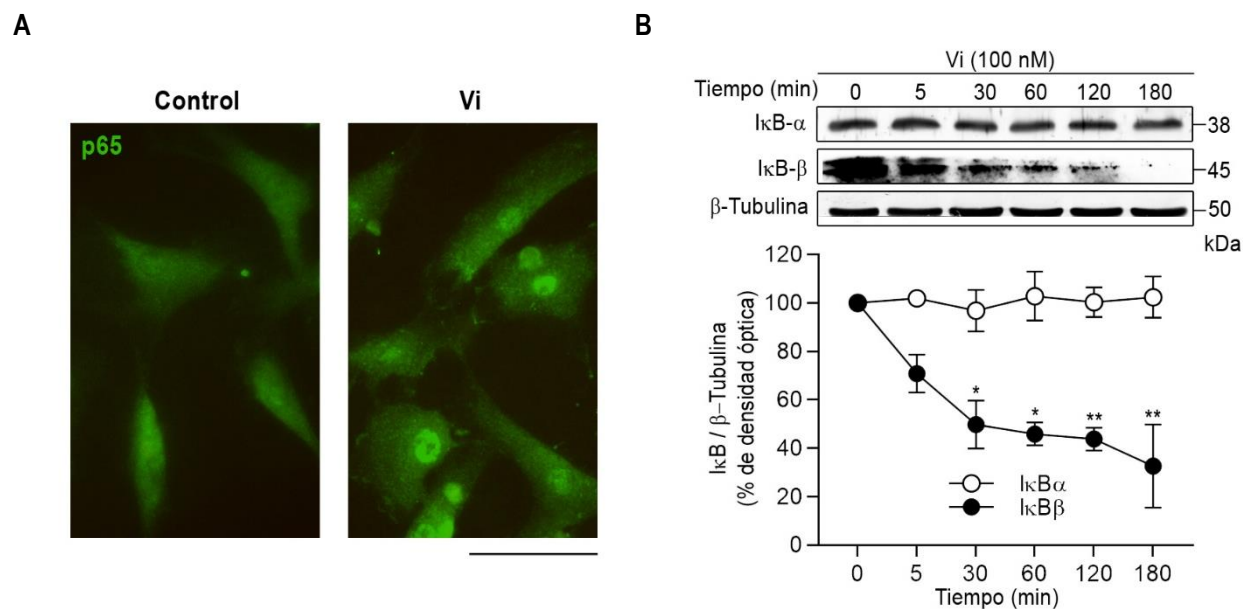


Figura 18. La vasoinhibina induce la traslocación de NF- κ B a través de promover la degradación del inhibidor de NF- κ B beta (I κ B- β) en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF). (A) Detección por inmunofluorescencia de NF- κ B (p65) en cultivos primarios de STF en ausencia (control) o presencia de 100 nM de vasoinhibina (Vi) por 1 h. (B) Cinética de degradación de las isoformas de I κ B (I κ B- α e I κ B- β) mediante western blot de STF en ausencia (0 min) o presencia (5, 30, 60, 120 y 180 min) de 100 nM de vasoinhibina (Vi). Los valores de las isoformas de I κ B fueron cuantificados mediante densitometría, normalizadas con respecto a la señal de β -Tubulina y graficada en porcentaje con respecto al valor de 0 min. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 3-4 cultivos independientes. * p <0.05; ** p <0.01.

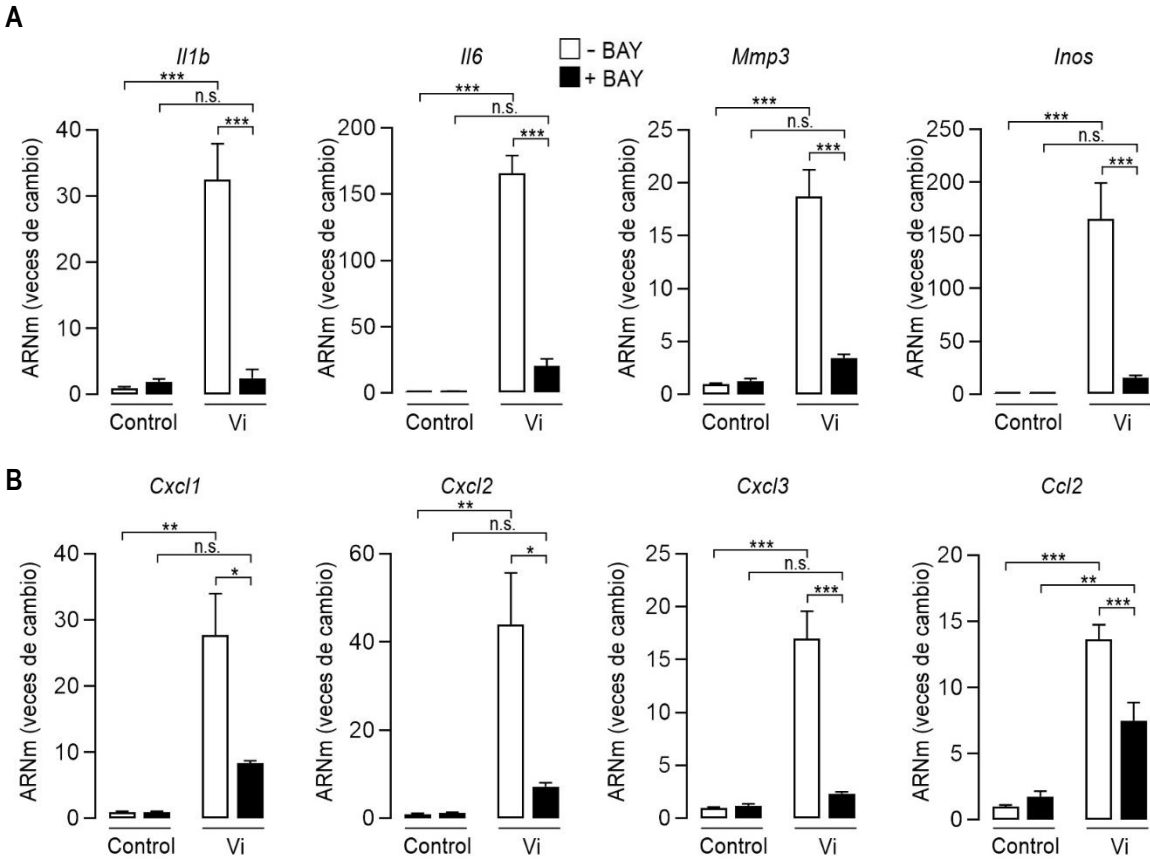


Figura 19. La vasoinhibina induce la expresión de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) a través de NF- κ B. Determinación mediante qRT-PCR de la expresión de los genes (A) proinflamatorios que codifican para la IL-1 β (*Il1b*), la IL-6 (*Il6*), la sintetasa de óxido nítrico inducible (*Inos*) y la metaloproteasa de matriz 3 (*Mmp3*); (B) y las quimiocinas *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* y *Ccl2* en cultivos primarios de STF tratados o no con vasoinhibina (100 nM) por 24 h y en presencia (+BAY) o ausencia (-BAY) de BAY 11-7085 (10 mM). Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 3-4 cultivos independientes. n.s., no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

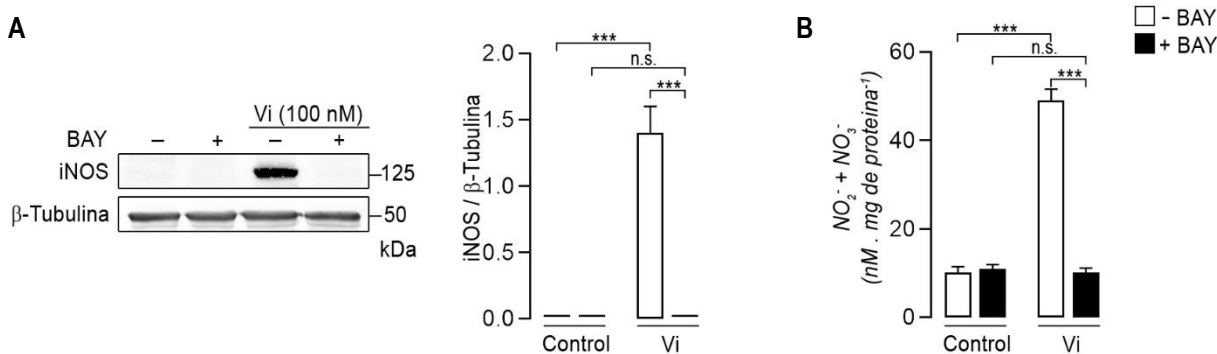


Figura 20. La vasoinhibina incrementa la generación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) a través de NF- κ B. (A) Análisis por western blot de iNOS en lisados de STF tratados o no 24 h con vasoinhibina (100 nM) y en presencia (+BAY) o ausencia (-BAY) de BAY 11-7085 (10 mM). Las barras muestran la cuantificación de iNOS/ β -tubulina por densitometría. (B) Producción de NO medida por la acumulación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) en el medio condicionado de STF tratados o no con vasoinhibina (100 nM) por 24 h y en presencia (+BAY) o ausencia (-BAY) de BAY 11-7085 (10 mM). Los resultados se presentan como la media \pm EE de 3-4 cultivos independientes. n.s., no significativo; *** $p < 0.001$.

7.4 Generación de vasoinhibina

7.4.1 La vasoinhibina circulante se incrementa bajo condiciones de inflamación.

Los resultados antes descritos ponen de manifiesto la capacidad de la vasoinhibina tanto de promover la inflamación como de reducirla (vía inhibir la angiogénesis y la vasopermeabilidad) en la artritis. Esta doble acción las convierte en reguladores eficientes del ajuste fino del proceso inflamatorio y señala la necesidad de entender los mecanismos que determinan la resultante final de sus efectos. Para validar su participación en el proceso inflamatorio es necesario demostrar la generación de la vasoinhibina en el modelo de artritis, que por presentar un incremento en la concentración de bajo condiciones de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , las cuales estimulan la producción de MMP, sugiere un microambiente propicio para la conversión de la PRL a vasoinhibina (Feldmann et al., 1996). Nuestros resultados mostraron que la

vasoinhibina circulante aumenta tanto en el modelo de AIA grave (Figura 21A), como posterior a la inyección intraarticular de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) (Figura 21B).

La determinación de vasoinhibina se ve obstaculizada por la ausencia de un método cuantitativo específico. Los anticuerpos anti-PRL o anti-vasoinhibina disponibles reaccionan tanto con la PRL como con la vasoinhibina por lo que es menester separarlas en base a su tamaño mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y posteriormente identificarlas y valorarlas mediante Western blot y densitometría. Este método es poco sensible y en el mejor de los casos semicuantitativo. Para aumentar la sensibilidad del método, optamos por utilizar animales hiperprolactinémicos, los ratones nulos para el receptor de la PRL (*Prlr*^{-/-}), donde no opera el asa de retroalimentación negativa de la PRL sobre su secreción hipofisiaria (Fitzgerald y Dinan, 2008). Efectivamente, al incrementar el sustrato (PRL) elevamos la probabilidad de observar el producto (vasoinhibina) y, con ello, obtener evidencia de que tiene lugar una mayor generación de vasoinhibina bajo condiciones de inflamación (Figura 21).

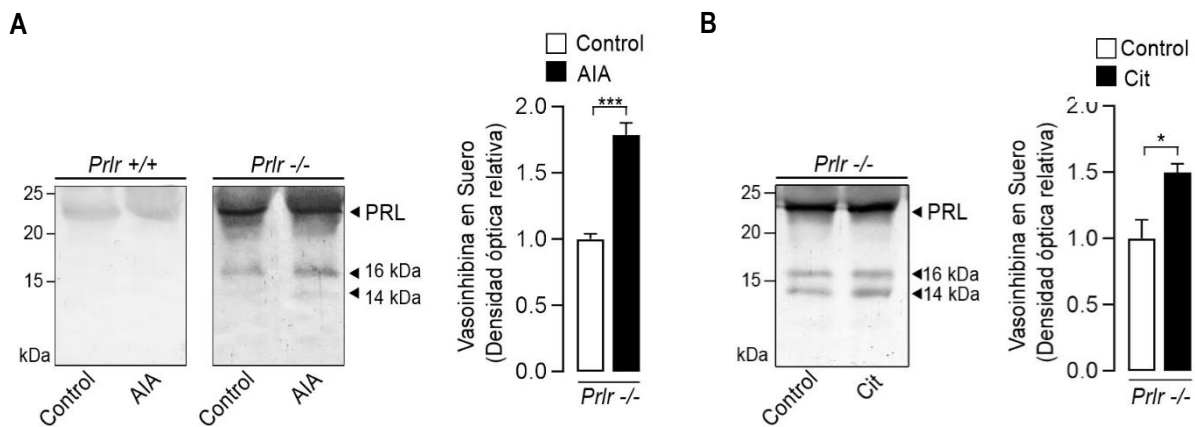


Figura 21. La vasoinhibina (Vi) circulante aumenta bajo condiciones de inflamación. (A) Western Blot y análisis por densitometría de la inmunoprecipitación de Vi en suero de ratones silvestres [*Prlr*(+/+)] y nulos [*Prlr*(-/-)] (b) para el receptor de la PRL. La inmunoprecipitación del suero se llevó a cabo 6 días después de la inyección intraarticular del antígeno (20 μ g). (B) Western Blot y análisis por densitometría de la inmunoprecipitación de Vi en suero de ratones nulos [*Prlr*(-/-)] para el receptor de la PRL inyectados o no con citocinas proinflamatorias (Cit: TNF- α , IL-1 β e IFN- γ). La inmunoprecipitación del suero se llevó a cabo 48 horas después de la inyección intraarticular de las citocinas. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE) de 3-4 animales por grupo. * p <0.05; *** p <0.001.

7.4.2 El corte de PRL a vasoinhibina se incrementa en la articulación artrítica por acción de las metaloproteasas de matriz y la catepsina D.

Para analizar si el incremento de la vasoinhibina circulante en la condición de artritis pudiera originarse en los tejidos de la articulación inflamada, incubamos una preparación estándar de PRL con un extracto de la articulación de animales sanos (control) y con AIA grave y evaluamos los productos de la proteólisis de la PRL mediante Western blot.

Encontramos que en la articulación artrítica aumenta la actividad de proteasas capaces de cortar la PRL a vasoinhibina tanto en la condición neutra por acción de las metaloproteasas de matriz (MMP) (Figura 22) como en la condición ácida por acción de la catepsina D (Figura 23).

Observamos que el lisado de la articulación artrítica estimula el procesamiento de PRL a vasoinhibina a pH neutro (pH 7) por acción de las MMP, debido a que los fragmentos de vasoinhibina obtenidos no se observaron en presencia de 1,10-fenantrolina (Fen), un inhibidor específico de esta familia de enzimas (Figura 22A). Por otro lado, en la condición ácida (pH 5) se bloqueó la generación de vasoinhibina en presencia de pepstatina A (PA), un inhibidor específico de catepsina D (Figura 23A). Cabe destacar que los fragmentos identificados en ambas condiciones coinciden en el peso molecular (14 y 16 KDa) aparente con los que observamos en la circulación (Figura 21).

A pesar de que las MMP y la catepsina D de los lisados articulares cortaron eficientemente a la PRL, y que la vasoinhibina fue detectada bajo condiciones reductoras (Figura 22A y 23A), solo una menor proporción de estos fragmentos fueron observados bajo condiciones no reductoras (Figura 22C y 23C). Solo se pudo observar una pequeña cantidad de fragmentos de vasoinhibina bajo condiciones no reductoras a pH neutro (Figura 22C) y no así a pH ácido (Figura 23C), lo cual indica que las reductasas responsables de reducir el puente disulfuro de la PRL cortada (PRLc) se encuentran activas en la condición neutra.

Por último, debido a que la PRL puede ser cortada tanto en fragmentos N-terminales con propiedades antiangiogénicas (vasoinhibina) como en fragmentos C-terminales carentes de la actividad antiangiogénica (Khurana et al., 1999), se corroboró la generación de fragmentos de vasoinhibina mediante el anticuerpo monoclonal INN-1 dirigido contra la región N-terminal tanto en la condición de pH neutra (Figura 22B) como en la de pH ácida (Figura 23B).

pH 7

Reductoras

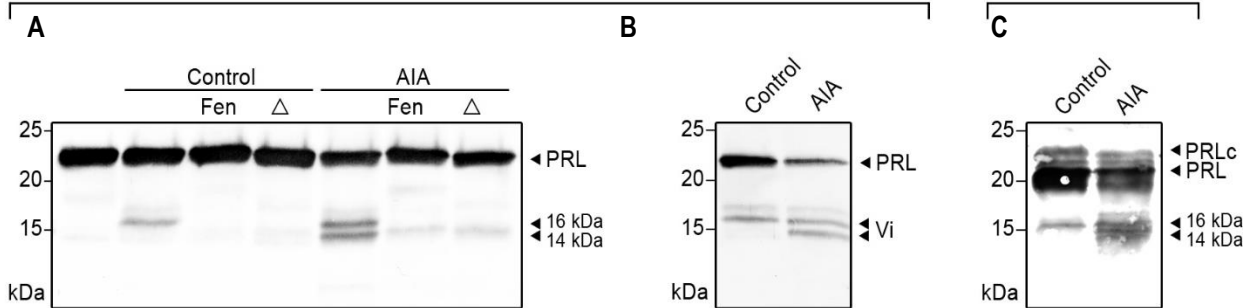
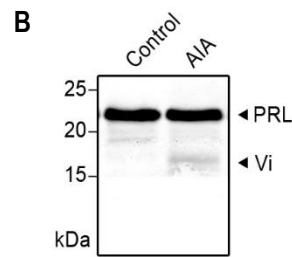
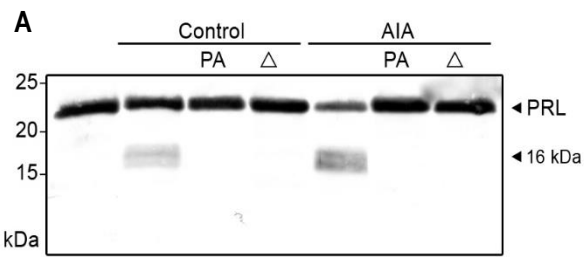


Figura 22. La generación de vasoinhibina a partir de la PRL se incrementa en la articulación de ratones con AIA a pH neutro por acción de las metaloproteasas de matriz. Western blots representativos de los productos proteicos generados a partir de la incubación de 200 ng de PRL de rata con 1 μ g de proteína proveniente de la articulación de ratones sanos (control) o bajo el modelo grave de artritis inducida por antígeno (AIA) incubados a pH neutro (pH 7). La reacción se incubó en ausencia o presencia de calor (Δ) y 1,10-fenantrolina (Fen) un inhibidor de la familia de MMP. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (**A**, **B**) y no reductoras (**C**), y los blots fueron incubados con un anticuerpo policlonal contra PRL de rata (**A**, **C**) o con un anticuerpo monoclonal contra la fracción N-terminal de la PRL de rata (INN-1) (**B**). La inmunorreactividad de la PRL, isoformas de la vasoinhibina (Vi) y la PRL cortada (PRLc) se indican con puntas de flecha. Los números de la izquierda indican el peso molecular de los marcadores de proteínas.

pH 5

Reductoras



No-Reductoras

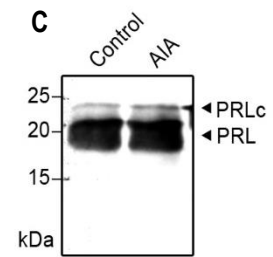


Figura 23. La generación de vasoinhibina a partir de la PRL se incrementa en la articulación de ratones con AIA a pH ácido por acción de la catepsina D. Western blots representativos de los productos proteicos generados a partir de la incubación de 200 ng de PRL de rata con 0.05 μ g de proteína proveniente de la articulación de ratones sanos (control) o con artritis inducida por antígeno (AIA) grave incubados a pH ácido (pH 5). La reacción se incubó en ausencia o presencia de calor (Δ) y pepstatina-A (PA) un inhibidor de la catepsina D. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (**A**, **B**) y no reductoras (**C**), y los blots fueron incubados con un anticuerpo policlonal contra PRL de rata (**A**, **C**) o con un anticuerpo monoclonal contra la fracción N-terminal de la PRL de rata (INN-1) (**B**). La inmunoreactividad de la PRL, isoformas de la vasoinhibina (Vi) y la PRL cortada (PRLc) se indican con puntas de flecha. Los números de la izquierda indican el peso molecular de los marcadores de proteínas.

8 DISCUSIÓN

Se ha considerado que la PRL produce un efecto negativo en la AR debido a que esta enfermedad es más frecuente en el sexo femenino donde las concentraciones de esta hormona son mayores. Además, la PRL se incrementa en algunos pacientes con AR y se conoce que estimula la actividad de células inmunes (C. Clapp et al., 2016). Sin embargo, la relación entre la PRL y la AR es más compleja. No existe una asociación entre los niveles sistémicos de PRL y la actividad de la enfermedad (Chuang y Molitch, 2007). Por ejemplo, la hiperprolactinemia fisiológica presente en el embarazo se asocia con la remisión de la AR (Ostensen y Villiger, 2007) y en la lactancia agrava la enfermedad en pacientes con AR (Barrett et al., 2000) pero reduce el riesgo de presentarla en personas sanas. Además, la PRL también tiene efectos supresores de la actividad de células inmunes (Costanza et al., 2015) y reduce la inflamación y la destrucción articular en modelos experimentales de AR (Adan et al., 2014; Ledesma-Colunga et al., 2017). Estas observaciones contradictorias han fomentado la búsqueda de mecanismos que aclaren el papel de la PRL en la AR y las artritis inflamatorias en general. En el presente trabajo aportamos pruebas de la conversión proteolítica de la PRL a vasoinhibina un modelo de artritis inflamatoria y demostramos una acción dual de la vasoinhibina capaz de estimular directamente e inhibir indirectamente (vía antiangiogénesis) la inflamación articular de forma dependiente del grado de inflamación y del tipo celular. Nuestras observaciones ofrecen una nueva perspectiva para entender el controvertido papel de la PRL en la AR.

La vasoinhibina comprende una familia de fragmentos de PRL que van de 5 a 18 kDa y corresponden a los primeros 58 a 159 residuos de aminoácidos de la PRL de acuerdo con el sitio de corte de proteasas que incluyen a la catepsina D (Piwnica et al., 2004), las MMP (Macotela et al., 2006), la proteína morfogenética ósea 1 (Ge et al., 2007), la trombina (Zamora et al., 2021) y la plasmina (Friedrich et al., 2021). La vasoinhibina inhibe la proliferación, supervivencia, permeabilidad y dilatación de los vasos sanguíneos (C. Clapp et al., 2015). Actúa uniéndose a un complejo formado por el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), la uroquinasa (uPA) y el receptor de la uroquinasa (uPAR) en las membranas de las células endoteliales (Bajou et al., 2014), bloqueando vías de señalización [Ras-Raf-MAPK, Ras-Tiam1-Rac-1-Pak1, PI3K-Akt y PLC-IP3-NOS endotelial (eNOS)] activadas por varios factores proangiogénicos (VEGF, bFGF, bradiquinina, IL-1) (C. Clapp et al., 2015). La vasoinhibina también estimula la respuesta inflamatoria de las células pulmonares (fibroblastos y las células epiteliales de tipo II) a través de la activación de la vía de señalización NF- κ B, que conduce a un aumento de la expresión de la iNOS y la producción de NO (Corbacho et al., 2000; Macotela et al., 2002).

Debido a estos efectos, la vasoinhibina podría impactar sobre el resultado de la acción de la PRL en la artritis. En el laboratorio hemos demostrado que la PRL reduce la inflamación articular, la formación de pannus y la pérdida ósea en ratas con artritis poliarticular inducida por adyuvante (Adan et al., 2013) y en ratones con artritis monoarticular inducida por adyuvante (Ledesma-Colunga et al., 2017). La protección implica la inhibición directa de la apoptosis de los condrocitos (Adan et al., 2013) y la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los fibroblastos sinoviales (Ledesma-Colunga et al., 2017) a través de la activación de STAT3, una vía de señalización canónica de la PRL (Ledesma-Colunga et al., 2017). Sin embargo, también pueden participar mecanismos indirectos a través de la generación de vasoinhibina. La angiogénesis es un acontecimiento clave para la formación del pannus y la inhibición de la angiogénesis es una terapia prometedora en la AR (Leblond et al., 2017).

Los nuevos vasos sanguíneos promueven y sostienen la formación del *pannus* en la AR a través de favorecer una mayor infiltración de células inmunes, la proliferación y la supervivencia celular (E. M. Paleolog, 2002a). Además, la mayor permeabilidad vascular determina el edema, la extravasación de células y de proteínas plasmáticas que a su vez contribuyen a la inflamación y a la producción de factores proangiogénicos necesarias para la formación de nuevos vasos sanguíneos (J. A. Nagy et al., 2008). De hecho, se ha demostrado que al bloquear el efecto del VEGF, uno de los principales factores que induce la angiogénesis y la permeabilidad vascular, se reduce la severidad de la AR (Miotla et al., 2000; Wang et al., 2013). Asimismo, la administración de factores antiangiogénicos (Storgard et al., 1999) o la terapia génica con vectores recombinantes derivados de virus adenoasociados que codifican para un factor antiangiogénico (angiostatina) protegen contra la artritis (Takahashi et al., 2005). Es por ello por lo que propusimos que la vasoinhibina a través de sus propiedades antiangiogénicas e inhibidoras de la permeabilidad vascular podría estar contrarrestando la progresión de la artritis y, por ende, favoreciendo la acción protectora de la PRL en este padecimiento.

En apoyo a esta posibilidad, en el presente proyecto encontramos que la terapia génica con vasoinhibina redujo la inflamación articular en un modelo murino de AIA grave, donde se observó una reducción del edema articular, de la hiperplasia del pannus, la densidad vascular, el número de vasos, la vasopermeabilidad del pannus y la expresión de genes proinflamatorios (*Il1b*, *Il6*, *Icam1*) y proangiogénicos (*Pecam1*, *Vegf*, *Vegfr2*, *Hif1a*).

Se ha demostrado que tratamientos que reducen la angiogénesis, además de disminuir la inflamación (Lainer-Carr y Brahn, 2007; Leblond et al., 2017), mejoran la artritis y disminuyen la erosión del hueso

subcondral (Chen et al., 2005; M. de Bandt et al., 2000). Nuestro estudio demostró que la vasoinhibina al igual que otros tratamientos antiangiogénicos (Chen et al., 2005; M. de Bandt et al., 2000) reduce el número de osteoclastos y la erosión ósea en el modelo de AIA grave.

La reducción en los parámetros de inflamación y en la progresión de la artritis como la hinchazón, formación del pannus, la densidad celular y la pérdida de hueso podrían ser consecuencia de los efectos inhibitorios de la vasoinhibina sobre la permeabilidad y angiogénesis articular.

Se conoce que la vasoinhibina inhibe el efecto vasoproliferativo y estimulador de la vasopermeabilidad de diferentes mediadores vasoactivos que se incrementan en la AR, incluyendo a la IL1 β (S. H. Lee et al., 2007), el factor de crecimiento de fibroblasto básico (o FGF-2) (Ferrara et al., 1991), la bradicinina (Thebault et al., 2011) y el VEGF (Gonzalez et al., 2004). En particular, el VEGF, es una de las principales sustancias vasoactivas en la AR y la artritis murina (Leblond et al., 2017; E. M. Paleolog, 2002a; Ewa M. Paleolog, 2009). La doble actividad del VEGF como mitógeno de las células endoteliales y promotor de la permeabilidad vascular estimula la enfermedad al aumentar la vascularización y el edema que determinan la formación de pannus y la inflamación articular (E. M. Paleolog, 2002a). En consecuencia, en ratones con artritis inducida por colágena, la deficiencia de VEGF (Mould et al., 2003) o el bloqueo de esta molécula con sFlt1 (A. Afuwape et al., 2003; Miotla et al., 2000), dominio extracelular soluble del receptor 1 de VEGF, o con anticuerpos anti-VEGF (Sone et al., 2001) reduce la inflamación, el pannus y la angiogénesis. Por ello es de gran relevancia determinar si los efectos sobre los vasos sanguíneos de la vasoinhibina en la articulación artrítica involucran un antagonismo funcional contra el VEGF.

Aquí demostramos que la inyección de VEGF en la articulación de la rodilla de ratones sanos aumenta la vasopermeabilidad local y que la coinyección de VEGF con la proteína vasoinhibina inhibe este efecto. La acción de la proteína vasoinhibina es similar a la del vector de vasoinhibina (AAV2-Vi) sobre la vasopermeabilidad articular inducida por el modelo de artritis grave, lo que confirma los efectos inhibidores vasculares de la vasoinhibina independientemente del método de administración. Además, estos resultados apoyan el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la permeabilidad inducida por VEGF que se ha reportado en cultivos de células endoteliales (García et al., 2008) y en la retina sana y diabética (García et al., 2008; Ramírez et al., 2011). Y lo que es más importante, estos resultados sugieren que la vasoinhibina puede inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos y la permeabilidad en la artritis a través de reducir las acciones del VEGF.

Nuestro trabajo propone que el antagonismo funcional de la vaso inhibina sobre la articulación artrítica involucra el bloqueo de la producción de óxido nítrico (NO) endotelial inducido por VEGF. El NO es un radical libre que juega un papel importante en la regulación de la vasoconstricción, la vasopermeabilidad y la extravasación de células inmunes y, por ende, del proceso inflamatorio (Bogdan, 2001). Consistentemente el NO está implicado en la patogénesis de la AR, donde los niveles de este radical libre correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad y la destrucción del cartílago (Blanco et al., 1995; Dey et al., 2016; Ueki et al., 1996). Esta molécula es sintetizada a partir de la L-arginina a través de diferentes isoformas de NO-sintetasa (NOS), siendo la isoforma de la NOS endotelial (eNOS) la que media los efectos del VEGF sobre la angiogénesis y la vasopermeabilidad (Fukumura et al., 2001). Se conoce que el VEGF activa la vía PI3K/Akt que activa a la eNOS a través de fosforilarla en la Ser1179 (Boo y Jo, 2003) y que la vaso inhibina previene esta fosforilación/activación a través de activar a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Garcia et al., 2014). En nuestro estudio demostramos que el vector AAV2-Vi previene la fosforilación de eNOS en la Ser1179 que tiene lugar en la articulación de los ratones bajo el modelo de AIA grave. Por lo tanto, la menor producción de NO a través del bloqueo de la actividad de eNOS parece ser uno de los mecanismos por el cual la vaso inhibina inhibe la angiogénesis y la vasopermeabilidad del pannus en la artritis.

Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que la vaso inhibina pudiera estar bloqueando la activación de eNOS inducida por el VEGF en la artritis. Sin embargo, además del VEGF, hay otras sustancias vasoactivas involucradas en la fisiopatología de la AR como la bradiquinina y la calreticulina que señalizan a través de la eNOS y, por lo tanto, pueden ser blanco de la vaso inhibina en la artritis (C. Clapp et al., 2015; Ding et al., 2014; Yang et al., 2017).

En contraste con estos resultados que prueban una acción antiinflamatoria de la vaso inhibina, indirectamente, a través de reducir angiogénesis y vasopermeabilidad, se ha reportado que la vaso inhibina incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias (IL1 α), quimiocinas (CXC y CC) y moléculas de adhesión (ICAM-1) en células endoteliales (Tabruyn et al., 2007), promueve la infiltración de leucocitos en un modelo de melanoma en ratón (Tabruyn et al., 2007), e induce la expresión de iNOS y la producción de NO en fibroblastos de pulmón a través de activar la vía de NF- κ B (Corbacho et al., 2000; Macotela et al., 2002). Dado que hemos propuesto que la PRL y su conversión a vaso inhibina podrían ser estrategias terapéuticas para combatir la AR (Adan et al., 2013; Ledesma-Colunga et al., 2017; G. Ortiz et al., 2020), es importante verificar posibles acciones proinflamatorias de la vaso inhibina en la articulación.

Consideramos que la acción proinflamatoria de la vasoinhibina pudo ser subestimada en el modelo de AIA grave debido al alto grado de inflamación articular (G. Ortiz et al., 2020). Además, se conoce que la contribución de la angiogénesis a la inflamación articular es directamente proporcional al grado de sinovitis (Clavel et al., 2003). De manera que la acción antiangiogénica pudo haber contrarrestado el posible efecto proinflamatorio de la vasoinhibina. Dadas estas consideraciones, decidimos implementar un modelo de AIA leve.

El modelo AIA se basa en la inyección local de antígeno en una articulación de un ratón hiperinmunizado (Brackertz et al., 1977). Una ventaja del modelo es que la gravedad de la artritis que provoca puede controlarse en función de la dosis del antígeno inyectado localmente (van den Berg et al., 2007). Esta propiedad del modelo nos permitió probar la vasoinhibina en diferentes contextos de inflamación. Por un lado, a través de inyectar 20 μg de antígeno (mBSA) en la articulación desarrollamos el modelo de AIA grave donde el alto grado de sinovitis y por ende la participación importante de los vasos sanguíneos nos permitió evaluar el efecto antiinflamatorio indirecto de la vasoinhibina en la artritis a través de inhibir la angiogénesis y vasopermeabilidad (Georgina Ortiz et al., 2020). Por otro lado, implementamos un modelo de AIA leve a través de inyectar 8 veces menos antígeno (2.5 μg de mBSA) donde, a diferencia del modelo de AIA grave, la inflamación no fuera máxima y la implicación de los vasos no oscureciera el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina.

El modelo de AIA leve que desarrollamos en el presente trabajo mostro una hinchazón y pannus articular 75% y 84% menor al modelo de AIA grave, respectivamente. En contraposición a los resultados observados en el modelo de AIA grave, el vector de AAV2-Vi inyectado aumentó la inflamación articular. La magnitud de la expresión de la vasoinhibina podría haber influido en el resultado de la inflamación. El nivel de expresión del ARNm del transgén de la vasoinhibina fue diferente entre el modelo grave y leve de AIA. Esta diferencia podría significar una menor producción/exposición a la vasoinhibina en la AIA grave frente a la leve y, por tanto, la posibilidad de que se necesiten mayores niveles de vasoinhibina para promover la inflamación, pero no para los efectos antiinflamatorios en la artritis. Probar el efecto de diferentes dosis de vasoinhibina en la AIA grave podría ayudar a abordar esta posibilidad.

En apoyo a que el vector de vasoinhibina incrementa la inflamación articular en la AIA leve, encontramos que el vector de AAV2-Vi incrementa la infiltración de leucocitos sinoviales y la expresión de mediadores proinflamatorios (*Il1b*, *Il6*, *Inos*, *Mmp3*, *Icam1*) y quimiocinas (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Ccl2*). Proponemos que

parte de estas acciones se podrían estar produciendo en los sinoviocitos tipo fibroblasto, células clave en el inicio y la perpetuación de la inflamación articular (Bartok y Firestein, 2010), debido a que la incubación de estas células con vasoinhibina recombinante elevó la expresión de mediadores de inflamación (*Il1b*, *Il6*, *Inos*, *Mmp3*) y quimiocinas (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* y *Ccl2*), así como los niveles de la proteína iNOS y la producción de NO. Además, al igual que en los fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2000; Macotela et al., 2002), el tratamiento con vasoinhibina en fibroblastos sinoviales, estimuló la degradación del inhibidor de NF- κ B ($I\kappa$ B) y, por tanto, la translocación nuclear del NF- κ B; y un inhibidor de la degradación de $I\kappa$ B impidió la acción de la vasoinhibina para indicar que NF- κ B es la vía de señalización responsable. Mas investigaciones son necesarias para determinar otros posibles blancos celulares de las acciones proinflamatorias de la vasoinhibina en la articulación. Debido a su importante participación en la fisiopatología de la AR, entre los blancos celulares a investigar en un futuro tenemos a los sinoviocitos tipo macrófago así como otro tipo de células inmunes residentes de la articulación e infiltradas en el proceso inflamatorio (G. S. Firestein y McInnes, 2017).

En conjunto nuestros hallazgos demuestran que la vasoinhibina puede tanto inhibir indirectamente (Georgina Ortiz et al., 2020) como estimular directamente (Ortiz et al., 2022) la inflamación articular en función de su concentración y/o el contexto inflamatorio y el tipo celular. El vector AAV2-Vi mejoró indirectamente la inflamación articular grave a través de sus acciones sobre las células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos (Georgina Ortiz et al., 2020), mientras que directamente agravó la inflamación articular leve a través de efectos sobre los sinoviocitos tipo fibroblastos que conforman la membrana sinovial (Ortiz et al., 2022).

Las acciones opuestas sobre la inflamación son comunes. Como comentamos al inicio de la discusión la propia PRL tiene efectos positivos y negativos sobre la inflamación que pueden depender de su concentración, de su síntesis por los tejidos articulares y de sus interacciones en el medio inflamatorio (C. Clapp et al., 2016). Asimismo, las principales citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α) funcionan como mediadores antiinflamatorios y los mediadores antiinflamatorios clásicos (IL-10, TGF- β 1, glucocorticoides) presentan efectos proinflamatorios (Cruz-Topete y Cidlowski, 2015; Shachar y Karin, 2013; Yeager et al., 2011; Zakharova y Ziegler, 2005) que dependen de la concentración de citocinas, el estadio de la enfermedad y la combinación con otras citocinas (Cruz-Topete y Cidlowski, 2015; Macfarlane et al., 2020; Shachar y Karin, 2013). Estas acciones opuestas de una misma molécula sobre la inflamación ponen de manifiesto la complejidad de la respuesta inflamatoria. En este sentido proponemos que las

acciones opuestas de la vasoinhibina actúan en función de la concentración, del tejido y del tiempo para prevenir la infección y limitar la destrucción de los tejidos articulares. Nuestra hipótesis es que la acción proinflamatoria de la vasoinhibina tiene lugar en los sinoviocitos tipo fibroblasto durante el inicio de la respuesta inflamatoria cuando la inflamación es leve; mientras que el efecto antiinflamatorio, conseguido mediante la inhibición de las células endoteliales, se manifiesta en una fase posterior cuando la inflamación es grave.

Además, pensamos que el procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibina podría ser un mecanismo que explique tanto los efectos positivos como negativos de esta hormona en la enfermedad. Por consiguiente, en el presente proyecto nos avocamos en determinar si la vasoinhibina se genera en la artritis inflamatoria, para determinar su posible participación en la patología y su influencia.

Los niveles circulantes de vasoinhibina sólo pueden determinarse de forma semicuantitativa mediante inmunoprecipitación-Western blot y este método no es lo suficientemente sensible para detectar la vasoinhibina circulante a menos que se utilicen ratones KO para el receptor de PRL (*Prlr*^{-/-}) que son hiperprolactinémicos. La hiperprolactinemia promueve la conversión de PRL en vasoinhibina al proporcionar más sustrato para las proteasas que median el corte proteolítico. Los ratones hiperprolactinémicos que sobreexpresan PRL en el hígado tienen mayores niveles de vasoinhibina circulante (A. S. Chang et al., 2016), y la hiperprolactinemia inducida farmacológicamente resulta en mayores niveles de vasoinhibina en tejidos y fluidos oculares de ratas (Adán-Castro et al., 2022) y humanos (Nuñez-Amaro et al., 2020). Aquí mostramos que las isoformas de vasoinhibina de 14 y 16 kDa aumentan en la circulación de ratones *Prlr*^{-/-} con AIA y en ratones *Prlr*^{-/-} no artríticos a los que se les inyecta en la articulación de la rodilla una combinación de citocinas proinflamatorias que provocan inflamación local. La generación de vasoinhibina por las proteasas en la articulación inflamada es un evento esperado. Las MMPs que escinden la PRL en vasoinhibina son producidas por los tejidos articulares (Macotela et al., 2006) y están incrementadas en las articulaciones de los pacientes con AR por la acción de las citocinas proinflamatorias (Iain B. McInnes y Schett, 2007; Takaishi et al., 2008). En el presente trabajo demostramos que la escisión de la PRL a las isoformas de vasoinhibina de 14 y 16 kDa se ve favorecida en los tejidos articulares con AIA y se lleva a cabo por las MMPs y la catepsina D, determinando que la vasoinhibina presente en la circulación de los ratones con AIA podría estarse generando en la articulación.

En conclusión, la paradoja de que la PRL tenga efectos tanto protectores como deletéreos en la AR se extienden a la vasoinhibina y, por tanto, debería explicarse mejor al considerar el eje PRL/vasoinhibina.

Este principio organizativo contempla que las acciones de la PRL se regulan a nivel del hipotálamo, la hipófisis y los tejidos diana no sólo mediante la alteración de la síntesis y la liberación de PRL sistémica y local, sino también mediante la regulación de la conversión proteolítica de la PRL en vaso inhibina, ya que ésta puede activar distintos complejos de receptores y tipos de células para ejercer acciones opuestas en los vasos sanguíneos y los tejidos articulares que afectan la resultante de la inflamación. Es necesario seguir investigando para comprender dónde y cómo se generan la PRL y la vaso inhibina y cómo interactúan mecánicamente para influir en la inflamación articular. Aunque la extrapolación directa de los hallazgos experimentales en la AR y a otras enfermedades inflamatorias en humanos es limitada, desentrañar las interacciones a nivel del eje PRL/vaso inhibina proporciona nuevos conocimientos para entender la fisiopatología de estas enfermedades y para el desarrollo de nuevos tratamientos.

9 CONCLUSIÓN

La vasoinhibina se genera a través del corte proteolítico de la PRL en la artritis experimental y promueve e inhibe la inflamación en la artritis a través de efectos directos sobre la producción de mediadores de inflamación en fibroblastos sinoviales (vía NF- κ B) y la inhibición de la angiogénesis (vía la desfosforilación/inhibición de la eNOS), respectivamente. Las acciones duales de la vasoinhibina en la artritis dependen de su concentración y/o la etapa y severidad de la enfermedad. Estos hallazgos ofrecen una explicación del efecto positivo y negativo de la PRL en la enfermedad y muestran un panorama más amplio de las posibles implicaciones terapéuticas que podrían ofrecer tanto la PRL como su metabolito la vasoinhibina en la AR.

10 REFERENCIAS

- Adán-Castro, E., Siqueiros-Márquez, L., Ramírez-Hernández, G., Díaz-Lezama, N., Ruíz-Herrera, X., Núñez, F. F., Núñez-Amaro, C. D., Robles-Osorio, M. L., Bertsch, T., & Triebel, J. (2022). Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *34*(4), e13091.
- Adan, N., Guzman-Morales, J., Ledesma-Colunga, M. G., Perales-Canales, S. I., Quintanar-Stephano, A., Lopez-Barrera, F., Mendez, I., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., Binart, N., Martinez de la Escalera, G., Thebault, S., & Clapp, C. (2013). Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, *123*(9), 3902-3913. doi:10.1172/JCI69485
- Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., Reyes-Lopez, A. L., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2014). Arthritis and prolactin: a phylogenetic viewpoint. *Gen Comp Endocrinol*, *203*, 132-136. doi:10.1016/j.ygcen.2014.01.011
- Afuwape, A., Feldmann, M., & Paleolog, E. (2003). Adenoviral delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) abrogates disease activity in murine collagen-induced arthritis. *Gene therapy*, *10*(23), 1950-1960.
- Afuwape, A. O., Kiriakidis, S., & Paleolog, E. M. (2002). The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol*, *17*(3), 961-972. doi:10.14670/hh-17.961
- Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Quiroz-Mercado, H., Berger, P., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(8), 2947-2953. doi:10.1167/iops.05-0173
- Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V. L., D'Amico, S., Nguyen, N. Q., Bouche, A., Tabruyn, S., Srahna, M., Carabin, J. Y., Nivelles, O., Paques, C., Cornelissen, I., Lion, M., Noel, A., Gils, A., Vinckier, S., Declerck, P. J., Griffioen, A. W., Dewerchin, M., Martial, J. A., Carmeliet, P., & Struman, I. (2014). PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med*, *20*(7), 741-747. doi:10.1038/nm.3552
- Baron, R., Neff, L., Van, P. T., Nefussi, J., & Vignery, A. (1986). Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *The American journal of pathology*, *122*(2), 363.
- Barrett, J. H., Brennan, P., Fiddler, M., & Silman, A. (2000). Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *43*(5), 1010-1015. doi:10.1002/1529-0131(200005)43:5<1010::AID-ANR8>3.0.CO;2-O
- Bartok, B., & Firestein, G. S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*, *233*(1), 233-255. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
- Bax, M., van Heemst, J., Huizinga, T. W., & Toes, R. E. (2011). Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*, *63*(8), 459-466.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*, *29*(1), 1-41. doi:10.1210/er.2007-0017
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews*, *17*(6), 639-669.
- Bendele, A. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, *1*(4), 377-385.
- Berczi, I., & Nagy, E. (1982). A possible role of prolactin in adjuvant arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *25*(5), 591-594.
- Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H., & Lotz, M. (1995). Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American journal of pathology*, *146*(1), 75.

- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10), 907-916. doi:10.1038/ni1001-907
- Bole-Feyssot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3), 225-268. doi:10.1210/edrv.19.3.0334
- Boo, Y. C., & Jo, H. (2003). Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(3), C499-508. doi:10.1152/ajpcell.00122.2003
- Brackertz, D., Mitchell, G. F., & Mackay, I. R. (1977). Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20(3), 841-850.
- Brennan, F. M., & McInnes, I. B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 118(11), 3537-3545. doi:10.1172/jci36389
- Burrage, P. S., Mix, K. S., & Brinckerhoff, C. E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11, 529-543.
- Castor, C. W. (1960). The microscopic structure of normal human synovial tissue. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 3(2), 140-151.
- Chang, A. S., Grant, R., Tomita, H., Kim, H.-S., Smithies, O., & Kakoki, M. (2016). Prolactin alters blood pressure by modulating the activity of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44), 12538-12543.
- Chang, K., Yang, S. M., Kim, S. H., Han, K. H., Park, S. J., & Shin, J. I. (2014). Smoking and rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 22279-22295.
- Chen, Y., Donnelly, E., Kobayashi, H., Debusk, L. M., & Lin, P. C. (2005). Gene therapy targeting the Tie2 function ameliorates collagen-induced arthritis and protects against bone destruction. *Arthritis Rheum*, 52(5), 1585-1594. doi:10.1002/art.21016
- Christodoulou, C., & Choy, E. H. (2006). Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*, 6(1), 13-19. doi:10.1007/s10238-006-0088-5
- Chuang, E., & Molitch, M. E. (2007). Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed*, 78 Suppl 1, 255-261.
- Clapp, C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*, 121(6), 2055-2064. doi:10.1210/endo-121-6-2055
- Clapp, C., Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., Solis-Gutierrez, M., Triebel, J., & Martinez de la Escalera, G. (2016). The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-016-2187-0
- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M. C., & Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab*, 17(8), 301-307. doi:10.1016/j.tem.2006.08.002
- Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J. C., Garcia, C., Guzman, J., Zamorano, M., Vega, C., Martin, C., Jeziorski, M. C., & de la Escalera, G. M. (2006). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res*, 35, 64-73. doi:10.1159/000094309
- Clapp, C., Lopez-Gomez, F. J., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotela, Y., Duenas, Z., Ochoa, A., Noris, G., Acosta, E., Garay, E., & Martinez de la Escalera, G. (1998). Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol*, 158(1), 137-144.
- Clapp, C., Ortiz, G., Garcia-Rodrigo, J. F., Ledesma-Colunga, M. G., Martínez-Díaz, O. F., Adán, N., & de la Escalera, G. M. (2022). Dual Roles of Prolactin and Vasoinhibin in Inflammatory Arthritis. *Frontiers in Endocrinology*, 13.

- Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., & Martinez de la Escalera, G. (2015). Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol*, 846, 83-95. doi:10.1007/978-3-319-12114-7_4
- Clapp, C., & weiner, R. (1992). A Specific, High Affinity, Saturable Binding Site for the 16-Kilodalton Fragment of Prolactin on Capillary Endothelial Cells. *Endocrinology*, 130(3), 1380-1386.
- Clavel, G., Bessis, N., & Boissier, M.-C. (2003). Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 70(5), 321-326.
- Corbacho, A. M., Nava, G., Eiserich, J. P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martinez De La Escalera, G., Freeman, B. A., & Clapp, C. (2000). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem*, 275(18), 13183-13186.
- Costanza, M., Binart, N., Steinman, L., & Pedotti, R. (2015). Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. *Autoimmun Rev*, 14(3), 223-230. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.005
- Crawford, T. N., Alfaro III, D. V., Kerrison, J. B., & Jablon, E. P. (2009). Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Current diabetes reviews*, 5(1), 8-13.
- Cruz-Soto, M. E., Scheiber, M. D., Gregerson, K. A., Boivin, G. P., & Horseman, N. D. (2002). Pituitary tumorigenesis in prolactin gene-disrupted mice. *Endocrinology*, 143(11), 4429-4436.
- Cruz-Topete, D., & Cidlowski, J. A. (2015). One hormone, two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 20-32.
- D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J., & Weiner, R. I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol*, 13(5), 692-704. doi:10.1210/mend.13.5.0280
- de Bandt, M., Grossin, M., Weber, A. J., Chopin, M., Elbim, C., Pla, M., Gougerot-Pocidallo, M. A., & Gaudry, M. (2000). Suppression of arthritis and protection from bone destruction by treatment with TNP-470/AGM-1470 in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(9), 2056-2063. doi:10.1002/1529-0131(200009)43:9<2056::aid-anr17>3.0.co;2-2
- De Bandt, M., Mahdi, M. H. B., Ollivier, V., Grossin, M., Dupuis, M., Gaudry, M., Bohlen, P., Lipson, K. E., Rice, A., & Wu, Y. (2003). Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4853-4859.
- Dey, P., Panga, V., & Raghunathan, S. (2016). A cytokine signalling network for the regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rheumatoid arthritis. *PloS one*, 11(9), e0161306.
- Diaz-Lezama, N., Wu, Z., Adan-Castro, E., Arnold, E., Vazquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., Ledesma-Colunga, M. G., Moreno-Carranza, B., Martinez de la Escalera, G., Colosi, P., & Clapp, C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Lab Invest*, 96(3), 283-295. doi:10.1038/labinvest.2015.135
- Ding, H., Hong, C., Wang, Y., Liu, J., Zhang, N., Shen, C., Wei, W., & Zheng, F. (2014). Calreticulin promotes angiogenesis via activating nitric oxide signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 178(2), 236-244. doi:10.1111/cei.12411
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*, 146(5), 1029-1039.
- Elshabrawy, H. A., Chen, Z., Volin, M. V., Ravella, S., Virupannavar, S., & Shahrara, S. (2015). The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*, 18(4), 433-448. doi:10.1007/s10456-015-9477-2
- Feldmann, M., Brennan, F. M., & Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 397-440.

- Ferrara, N., Clapp, C., & Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, *129*(2), 896-900. doi:10.1210/endo-129-2-896
- Figueroa, F., Carrion, F., Martinez, M., Rivero, S., & Mamani, I. (1997). Bromocriptine induces immunological changes related to disease parameters in rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*, *36*(9), 1022-1023.
- Firestein, G. S. (1996). Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, *39*(11), 1781-1790.
- Firestein, G. S. (1999). Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, *103*(1), 3-4.
- Firestein, G. S., Budd, R. C., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2012). *Kelley's Textbook of Rheumatology E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Firestein, G. S., Budd, R. C., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2016). *Kelley and Firestein's textbook of rheumatology*: Elsevier Health Sciences.
- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, *46*(2), 183-196. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006
- Firestein, G. S., Paine, M. M., & Littman, B. H. (1991). Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids (Vol. 34, pp. 1094-1105): Wiley Online Library.
- Fitzgerald, P., & Dinan, T. G. (2008). Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *Journal of Psychopharmacology*, *22*(2_suppl), 12-19.
- Fojtikova, M., Tomasová Studýnková, J., Filkova, M., Lacinova, Z., Gatterova, J., Pavelka, K., Vencovský, J., & Šenolt, L. (2010). Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*, *28*(6), 849.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery*, *6*(4), 273-286.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, *16*(9), 4604-4613.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, *80*(4), 1523-1631.
- Friedrich, C., Neugebauer, L., Zamora, M., Robles, J. P., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Bertsch, T., & Triebel, J. (2021). Plasmin generates vaso-inhibin-like peptides by cleaving prolactin and placental lactogen. *Mol Cell Endocrinol*, *538*, 111471. doi:10.1016/j.mce.2021.111471
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., & Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(5), 2604-2609. doi:10.1073/pnas.041359198
- Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., Yu-Lee, L.-Y., & Lin, S.-H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification*, *28*(2), 252-258. doi:10.1016/s1046-5928(02)00639-3
- García, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., López-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernández-Montiel, H. L., Lin, S. H., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2008). Vaso-inhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein

- phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118(6), 2291-2300. doi:10.1172/JCI34508
- Garcia, C., Nunez-Anita, R. E., Thebault, S., Arredondo Zamarripa, D., Jeziorsky, M. C., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2014). Requirement of phosphorylatable endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 for vasoinhibin-mediated inhibition of endothelial cell migration and proliferation in vitro. *Endocrine*, 45(2), 263-270. doi:10.1007/s12020-013-9964-4
- Gaytan, F., Morales, C., Bellido, C., Aguilar, E., & Sanchez-Criado, J. (1997). Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. *Biology of reproduction*, 57(2), 478-486.
- Ge, G., Fernandez, C. A., Moses, M. A., & Greenspan, D. S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10010-10015. doi:10.1073/pnas.0704179104
- Goldhar, A. S., Vonderhaar, B. K., Trott, J. F., & Hovey, R. C. (2005). Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol*, 232(1-2), 9-19. doi:10.1016/j.mce.2005.01.005
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S. H., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, 145(12), 5714-5722. doi:10.1210/en.2004-0647
- Gonzalez, C., Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Garcia, C., Rivera, J. C., Macotela, Y., Aranda, J., Lemini, M., Arias, J., Ibarquengoitia, F., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest*, 87(10), 1009-1017. doi:10.1038/labinvest.3700662
- Han, Z. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*, 108, 73-81.
- Harada, K. M., Hiroshi Yoshida, Shotaro Sakisaka, Eitaro Taniguchi, Takumi Kawaguchi, Mamoru Ariyoshi, Tomohisa Saiki, Masaharu Sakamoto, Kensei Nagata, Michio Sata, Katsuhiko Matsuo, Kyuichi Tanikawa, Masaru. (1998). Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, 27(5), 377-380.
- Hardy, R. S., Hulso, C., Liu, Y., Gasparini, S. J., Fong-Yee, C., Tu, J., Stoner, S., Stewart, P. M., Raza, K., Cooper, M. S., Seibel, M. J., & Zhou, H. (2013). Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation. *Arthritis Res Ther*, 15(1), R24. doi:10.1186/ar4158
- Harris Jr, E. (1992). Excitement in synovium: the rapid evolution of understanding of rheumatoid arthritis and expectations for therapy. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 32, 3-5; discussion 5.
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., Luchtefeld, M., Poli, V., Schneider, M. D., Balligand, J. L., Desjardins, F., Ansari, A., Struman, I., Nguyen, N. Q., Zschemisch, N. H., Klein, G., Heusch, G., Schulz, R., Hilfiker, A., & Drexler, H. (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*, 128(3), 589-600. doi:10.1016/j.cell.2006.12.036
- Hill, A., Duran, J., & Purcell, P. (2014). Lubricin protects the temporomandibular joint surfaces from degeneration. *PloS one*, 9(9), e106497.
- Hirai, Y., Migita, K., Honda, S., Ueki, Y., Yamasaki, S., Urayama, S., Kamachi, M., Kawakami, A., Ida, H., & Kita, M. (2001). Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci*, 68(8), 913-920.
- Horseman, N. D., & Yu-Lee, L.-Y. (1994). Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocrine reviews*, 15(5), 627-649.

- Hui, A. Y., McCarty, W. J., Masuda, K., Firestein, G. S., & Sah, R. L. (2012). A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4(1), 15-37.
- Johansson, M., Olerud, J., Jansson, L., & Carlsson, P.-O. (2009). Prolactin treatment improves engraftment and function of transplanted pancreatic islets. *Endocrinology*, 150(4), 1646-1653.
- Kahlenberg, J. M., & Fox, D. A. (2011). Advances in the Medical Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Hand clinics*, 27(1), 11-20. doi:10.1016/j.hcl.2010.09.002
- Kaplan, M. J. (2006). Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, 18(3), 289-297.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology*, 18(1), 621-663.
- Karlson, E. W., Mandl, L. A., Hankinson, S. E., & Grodstein, F. (2004). Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis?: Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis & Rheumatism*, 50(11), 3458-3467. doi:10.1002/art.20621
- Keyszer, G. M., Heer, A. H., Kriegsmann, J., Geiler, T., Trabandt, A., Keysser, M., Gay, R. E., & Gay, S. (1995). Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by in situ hybridization. *Arthritis Rheum*, 38(7), 976-984.
- Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R., & Ben-Jonathan, N. (1999). Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology*, 140(9), 4127-4132. doi:10.1210/endo.140.9.6955
- Kini, U., & Nandeesh, B. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism *Radionuclide and hybrid bone imaging* (pp. 29-57): Springer.
- Koch, A. (2003). Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 62(Suppl 2), ii60-ii67. doi:10.1136/ard.62.suppl_2.ii60
- Koch, A. E., Kunkel, S. L., Shah, M. R., Hosaka, S., Halloran, M. M., Haines, G. K., Burdick, M. D., Pope, R. M., & Strieter, R. M. (1995). Growth-related gene product alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, 155(7), 3660-3666.
- Kramer, C. K., Tourinho, T. F., de Castro, W. P., & da Costa Oliveira, M. (2005). Association between systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, hyperprolactinemia and thyroid autoantibodies. *Archives of medical research*, 36(1), 54-58.
- Krishnamra, N., & Cheeveewattana, V. (1994). 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. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72(12), 1521-1527.
- Lainer-Carr, D., & Brahn, E. (2007). Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 3(8), 434-442. doi:10.1038/ncprheum0559
- Leblond, A., Allanore, Y., & Avouac, J. (2017). Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 16(6), 594-601. doi:10.1016/j.autrev.2017.04.005
- Ledesma-Colunga, M. G., Adan, N., Ortiz, G., Solis-Gutierrez, M., Lopez-Barrera, F., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2017). Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*, 19(1), 93. doi:10.1186/s13075-017-1290-4
- Lee, D. M. (2007). Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*, 315, 1006-1010.
- Lee, S. H., Kunz, J., Lin, S. H., & Yu-Lee, L. Y. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res*, 67(22), 11045-11053. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0986

- Lotinun, S., Limlomwongse, L., & Krishnamra, N. (1998). The study of a physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 76(2), 218-228.
- Lu, J., Kasama, T., Kobayashi, K., Yoda, Y., Shiozawa, F., Hanyuda, M., Negishi, M., Ide, H., & Adachi, M. (2000). Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Regulation of Murine Collagen-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*, 164(11), 5922-5927. doi:10.4049/jimmunol.164.11.5922
- Ma, J. D., Zhou, J. J., Zheng, D. H., Chen, L. F., Mo, Y. Q., Wei, X. N., Yang, L. J., & Dai, L. (2014). Serum matrix metalloproteinase-3 as a noninvasive biomarker of histological synovitis for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*, 2014, 179284. doi:10.1155/2014/179284
- MacDonald, I. J., Liu, S.-C., Su, C.-M., Wang, Y.-H., Tsai, C.-H., & Tang, C.-H. (2018). Implications of angiogenesis involvement in arthritis. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2012.
- Macfarlane, E., Seibel, M. J., & Zhou, H. (2020). Arthritis and the role of endogenous glucocorticoids. *Bone Research*, 8(1), 1-17.
- Macotella, Y., Aguilar, M. B., Guzmán-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeño, C., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Lavallo, C., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*, 119(Pt 9), 1790-1800. doi:10.1242/jcs.02887
- Macotella, Y., Mendoza, C., Corbacho, A. M., Cosio, G., Eiserich, J. P., Zentella, A., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2002). 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J Endocrinol*, 175(3), R13-18.
- Marano, R. J., & Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Molecular endocrinology*, 28(5), 622-633.
- Mateo, L., Nolla, J., Bonnin, M., Navarro, M., & Roig-Escofet, D. (1998). High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 25(11), 2077-2082.
- Matera, L., Cesano, A., Bellone, G., & Oberholtzer, E. (1992). Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain, behavior, and immunity*, 6(4), 409-417.
- McCachren, S. S., Haynes, B. F., & Niedel, J. E. (1990). Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *Journal of clinical immunology*, 10(1), 19-27.
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7(6), 429-442.
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365(23), 2205-2219. doi:10.1056/NEJMra1004965
- Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Aguilar, L., Amalric, F., & Girard, J.-P. (2004). Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther*, 6(2), 1-13.
- Miotla, J., Maciewicz, R., Kendrew, J., Feldmann, M., & Paleolog, E. (2000). Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest*, 80(8), 1195-1205.
- Montgomery, D. (2001). Prolactin production by immune cells. *Lupus*, 10(10), 665-675.
- Morales-Ducet, J., Wayner, E., Elices, M. J., Alvaro-Gracia, J. M., Zvaifler, N. J., & Firestein, G. S. (1992). Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *The Journal of Immunology*, 149(4), 1424-1431.
- Moreno-Carranza, B., Goya-Arce, M., Vega, C., Adan, N., Triebel, J., Lopez-Barrera, F., Quintanar-Stephano, A., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2013). 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(7), R720-726. doi:10.1152/ajpregu.00282.2013
- Morikawa, K., Oseko, F., & Morikawa, S. (1994). Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. *Clinical & Experimental Immunology*, 95(3), 514-518.
- Mould, A. W., Tonks, I. D., Cahill, M. M., Pettit, A. R., Thomas, R., Hayward, N. K., & Kay, G. F. (2003). Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum*, 48(9), 2660-2669. doi:10.1002/art.11232
- Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B. N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R. E., & Gay, S. (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 149(5), 1607-1615.
- Muller, W. A. (2009). Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res*, 105(3), 223-230. doi:10.1161/circresaha.109.200717
- Nagafuchi, H., Suzuki, N., Kaneko, A., Asai, T., & Sakane, T. (1999). Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 26(9), 1890-1900.
- Nagy, E., Chalmers, I. M., Baragar, F. D., Friesen, H. G., & Berczi, I. (1991). Prolactin deficiency in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 18(11), 1662-1668.
- Nagy, J. A., Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*, 11(2), 109-119. doi:10.1007/s10456-008-9099-z
- Neidhart, M., & Flückiger, E. (1992). Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology*, 77(3), 449.
- Nguyen, N. Q., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S. P., Foidart, J. M., Noel, A., Martial, J. A., & Struman, I. (2007). Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol Ther*, 15(12), 2094-2100. doi:10.1038/sj.mt.6300294
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213.
- Núñez-Amaro, C. D., Moreno-Vega, A. I., Adan-Castro, E., Zamora, M., Garcia-Franco, R., Ramirez-Neria, P., Garcia-Roa, M., Villalpando, Y., Robles, J. P., & Ramirez-Hernandez, G. (2020). Levosulpiride increases the levels of prolactin and antiangiogenic vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Translational Vision Science & Technology*, 9(9), 27-27.
- Ogueta, S., Munoz, J., Obregon, E., Delgado-Baeza, E., & Garcia-Ruiz, J. P. (2002). Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*, 190(1-2), 51-63.
- Okada, Y., Nakanishi, I., & Kajikawa, K. (1981). Ultrastructure of the mouse synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 24(6), 835-843.
- Ollier, W. E., Harrison, B., & Symmons, D. (2001). What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15(1), 27-48. doi:10.1053/berh.2000.0124
- Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M. G., Wu, Z., García-Rodrigo, J. F., Adan, N., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2020). Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Laboratory Investigation*, 100(8), 1068-1079.
- Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M. G., Wu, Z., García-Rodrigo, J. F., Adan, N., Martínez-Díaz, O. F., De Los Ríos, E. A., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2022). Vasoinhibin is

- Generated and Promotes Inflammation in Mild Antigen-induced Arthritis. *Endocrinology*, 163(5), bqac036.
- Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M. G., Wu, Z., García-Rodrigo, J. F., Adan, N., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2020). Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Lab Invest*. doi:10.1038/s41374-020-0432-5
- Ospelt, C., Pap, T., & Gay, S. (2008). Synovial Fibroblasts: Important Players in the Induction. *Rheumatoid Arthritis E-Book*, 136.
- Ostensen, M., & Villiger, P. M. (2007). The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol*, 29(2), 185-191. doi:10.1007/s00281-007-0072-5
- Paleolog, E. M. (2002a). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 4(Suppl. 3), 81-90.
- Paleolog, E. M. (2002b). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 4 Suppl 3, S81-90. doi:10.1186/ar575
- Paleolog, E. M. (2009). The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? *International journal of experimental pathology*, 90(3), 249-261. doi:10.1111/j.1365-2613.2009.00640.x
- Pap, T. (2001). Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum.*, 44, 676-681.
- Pereira Suarez, A. L., Lopez-Rincon, G., Martinez Neri, P. A., & Estrada-Chavez, C. (2015). Prolactin in inflammatory response. *Adv Exp Med Biol*, 846, 243-264. doi:10.1007/978-3-319-12114-7_11
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J. A., Kelly, P. A., & Goffin, V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*, 18(10), 2522-2542. doi:10.1210/me.2004-0200
- Radu, M., & Chernoff, J. (2013). An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*(73), e50062. doi:10.3791/50062
- Ramírez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M. C., Arnold, E., Díaz-Lezama, N., Martínez de la Escalera, G., Colosi, P., & Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), 8944-8950. doi:10.1167/iovs.11-8190
- Ratcliffe, M. J. (2016). *Encyclopedia of immunobiology*: Academic Press.
- Salesi, M., Sadeghihaddadzavareh, S., Nasri, P., Namdarigharaghani, N., Farajzadegan, Z., & Hajalikhani, M. (2013). The role of bromocriptine in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 16(6), 662-666. doi:10.1111/1756-185x.12015
- Saraiva, F. (2021). Ultrasound-guided synovial biopsy: a review. *Frontiers in Medicine*, 276.
- Scappaticci, F. A., Skillings, J. R., Holden, S. N., Gerber, H.-P., Miller, K., Kabinavar, F., Bergsland, E., Ngai, J., Holmgren, E., & Wang, J. (2007). Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(16), 1232-1239.
- Schett, G., Stach, C., Zwerina, J., Voll, R., & Manger, B. (2008). How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 58(10), 2936-2948.
- Schett, G., & Teitelbaum, S. L. (2009). Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res*, 24(7), 1142-1146. doi:10.1359/jbmr.090533
- Schuerwegh, A. J., Dombrecht, E. J., Stevens, W. J., Van Offel, J. F., Bridts, C. H., & De Clerck, L. S. (2003). Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*, 11(9), 681-687.

- Schuff, K. G., Hentges, S. T., Kelly, M. A., Binart, N., Kelly, P. A., Iuvone, P. M., Asa, S. L., & Low, M. J. (2002). Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and-independent mechanisms. *J Clin Invest*, *110*(7), 973-981.
- Shachar, I., & Karin, N. (2013). The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol*, *93*(1), 51-61.
- Smith, M. D., & Wechalekar, M. D. (2015). The synovium *Rheumatology: Sixth Edition* (pp. 27-32): Elsevier Inc.
- Sone, H., Kawakami, Y., Sakauchi, M., Nakamura, Y., Takahashi, A., Shimano, H., Okuda, Y., Segawa, T., Suzuki, H., & Yamada, N. (2001). Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *281*(2), 562-568. doi:10.1006/bbrc.2001.4395
- Spangelo, B. L., Hall, N. R., Ross, P. C., & Goldstein, A. L. (1987). Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A-induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin. *Immunopharmacology*, *14*(1), 11-20.
- Storgard, C. M., Stupack, D. G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., Fox, R. I., & Cheresh, D. A. (1999). Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha v \beta 3$ antagonist. *Journal of Clinical Investigation*, *103*(1), 47-54.
- Szekanecz, Z., Besenyei, T., Paragh, G., & Koch, A. E. (2009). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, *42*(7), 563-573.
- Szekanecz, Z., Kim, J., & Koch, A. E. (2003). *Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Tabruyn, S. P., Sabatel, C., Nguyen, N. Q., Verhaeghe, C., Castermans, K., Malvaux, L., Griffioen, A. W., Martial, J. A., & Struman, I. (2007). The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol*, *21*(6), 1422-1429. doi:10.1210/me.2007-0021
- Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. A., & Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol*, *17*(9), 1815-1823. doi:10.1210/me.2003-0132
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, *107*(1), 7-11.
- Takahashi, H., Kato, K., Miyake, K., Hirai, Y., Yoshino, S., & Shimada, T. (2005). Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Rheumatol*, *23*(4), 455-461.
- Takaishi, H., Kimura, T., Dalal, S., Okada, Y., & D'Armiento, J. (2008). Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol*, *9*(1), 47-54. doi:10.2174/138920108783497659
- Thebault, S., González, C., García, C., Zamarripa, D. A., Nava, G., Vaca, L., López-Casillas, F., De la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2011). Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca²⁺ Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals*, *4*(12), 1052-1069. doi:10.3390/ph4071052
- Tortora, G. J., Derrickson, B., Tzal, K., de los Ángeles Gutiérrez, M., & Klajn, D. (2002). *Principios de anatomía y fisiología* (Vol. 7): OXFORD University press.
- Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C. F., Hufner, M., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2015). Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, ajpgu.00256.02015. doi:10.1152/ajpregu.00256.2015

- Triebel, J., Macotela, Y., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2011). Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB Life*, 63(10), 806-810. doi:10.1002/iub.518
- Ueki, Y., Miyake, S., Tominaga, Y., & Eguchi, K. (1996). Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 23(2), 230-236.
- Unemori, E. N., Bair, M., Bauer, E., & Amento, E. (1991). Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 23477-23482.
- van den Berg, W. B., Joosten, L. A., & van Lent, P. L. (2007). Murine antigen-induced arthritis. *Methods Mol Med*, 136, 243-253.
- Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F. C., & Hazes, J. M. (2002). How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46(2), 357-365.
- Wang, Y., Da, G., Li, H., & Zheng, Y. (2013). Avastin Exhibits Therapeutic Effects on Collagen-Induced Arthritis in Rat Model. *Inflammation*, 36(6), 1460-1467. doi:10.1007/s10753-013-9687-y
- Westra, J., Molema, G., & Kallenberg, C. (2010). Hypoxia-inducible factor-1 as regulator of angiogenesis in rheumatoid arthritis-therapeutic implications. *Current medicinal chemistry*, 17(3), 254-263.
- Whitacre, C. C., Reingold, S. C., & O'Looney, P. A. (1999). A Gender Gap in Autoimmunity. *Science*, 283(5406), 1277-1278. doi:10.1126/science.283.5406.1277
- Woessner Jr, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, 5(8), 2145-2154.
- Yang, A., Zhou, J., Wang, B., Dai, J., Colman, R. W., Song, W., & Wu, Y. (2017). A critical role for plasma kallikrein in the pathogenesis of autoantibody-induced arthritis. *Faseb j*, 31(12), 5419-5431. doi:10.1096/fj.201700018R
- Yeager, M. P., Pioli, P. A., & Guyre, P. M. (2011). Cortisol exerts bi-phasic regulation of inflammation in humans. *Dose-response*, 9(3), dose-response. 10-013. Yeager.
- Zakharova, M., & Ziegler, H. K. (2005). Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 175(8), 5024-5033.
- Zamora, M., Robles, J. P., Aguilar, M. B., Romero-Gómez, S. J., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2021). Thrombin Cleaves Prolactin Into a Potent 5.6-kDa Vasoinhibin: Implication for Tissue Repair. *Endocrinology*, 162(12). doi:10.1210/endocr/bqab177
- Zermeno, C., Guzman-Morales, J., Macotela, Y., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Kouri, J. B., Lavalle, C., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2006). Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol*, 189(2), R1-8. doi:10.1677/joe.1.06766

11 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista esquemática de una articulación normal y una articulación afectada por AR.	4
Figura 2. Representación esquemática de la membrana sinovial y la síntesis del líquido sinovial.	6
Figura 3. El vector AAV2 de vasoinhibina (AAV2-Vi) transduce la vasoinhibina.	33
Figura 4. La sobreexpresión de vasoinhibina (Vi) mediante la inyección intraarticular de AAV2-Vi reduce la circunferencia de la articulación en el modelo de AIA grave y la incrementa en la AIA leve.	34
Figura 5. Los AAV2-Vi reducen el pannus en la articulación de ratones con AIA grave.	37
Figura 6. Los AAV2-Vi reducen la densidad celular del pannus en la articulación de ratones con AIA grave.	38
Figura 7. Los AAV2-Vi reducen la pérdida de hueso distal en la articulación de ratones con AIA grave.	39
Figura 8. Los AAV2-Vi reducen la expresión de marcadores vasculares, angiogénicos y proinflamatorios en la articulación de ratones con AIA grave.	41
Figura 9. Los AAV2-Vi reducen la densidad vascular del pannus en la articulación de ratones con AIA grave.	43
Figura 10. Los AAV2-Vi reducen la vasopermeabilidad del pannus en la articulación de ratones con AIA grave.	45
Figura 11. La vasoinhibina inhibe la vasopermeabilidad de la membrana sinovial inducida por el VEGF.	45
Figura 12. Los AAV2-Vi previene la fosforilación del residuo Ser1179 de eNOS en la AIA grave.	46
Figura 13. Los AAV2-Vi incrementan el pannus en la articulación de ratones con AIA leve.	48
Figura 14. Los AAV2-Vi incrementan la infiltración leucocitaria en el pannus de la articulación de ratones con AIA leve.	49
Figura 15. Los AAV2-Vi incrementan la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en la articulación de ratones con AIA leve.	51
Figura 16. La vasoinhibina incrementa la expresión génica de mediadores proinflamatorios y quimiocinas de forma dosis dependiente en sinoviocitos tipo fibroblastos (STF).	53
Figura 17. La vasoinhibina incrementa la generación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) de forma dosis dependiente en sinoviocitos tipo fibroblastos (STF).	54

- Figura 18.** La vasoinhibina induce la traslocación de NF- κ B a través de promover la degradación del inhibidor de NF- κ B beta (I κ B- β) en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF). 56
- Figura 19.** La vasoinhibina induce la expresión de mediadores proinflamatorios y quimiocinas en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) a través de NF- κ B. 57
- Figura 20.** La vasoinhibina incrementa la generación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) en los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) a través de NF- κ B. 58
- Figura 21.** La vasoinhibina (Vi) circulante aumenta bajo condiciones de inflamación. 59
- Figura 22.** La generación de vasoinhibina a partir de la PRL se incrementa en la articulación de ratones con AIA a pH neutro por acción de las metaloproteasas de matriz. 61
- Figura 23.** La generación de vasoinhibina a partir de la PRL se incrementa en la articulación de ratones con AIA a pH ácido por acción de la catepsina D. 62

12 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos.

13 ANEXOS

13.1 Congresos

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibins are proinflammatory in synovial fibroblasts and are generated in mice treated with proinflammatory cytokines or subjected to antigen-induced arthritis. Jornadas Académicas, Instituto de Neurobiología, UNAM. Septiembre 2017. Póster.

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Generation and effects of vasoinhibins on the joint vasculature in mice subjected to antigen-induced arthritis. Jornadas Académicas, Instituto de Neurobiología, UNAM. Septiembre 2018. Póster

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, García-Rodrigo JF, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibin reduce synovial angiogenesis and vasopermeability in a model of inflammatory arthritis. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Agosto 2019. Oral.

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, García-Rodrigo JF, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibin reduces joint angiogenesis and vasopermeability in murine antigen-induced arthritis. Jornadas Académicas, Instituto de Neurobiología, UNAM. September 2019.

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibin protects against inflammatory arthritis by reducing angiogenesis and vasopermeability of the pannus that leads to joint inflammation and bone loss. Jornadas Académicas, Instituto de Neurobiología, UNAM, (virtual). August 2020. Oral.

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibin is generated during and protects against murine inflammatory arthritis by reducing angiogenesis and vasopermeability of the pannus. The growth hormone/prolactin family in biology and disease conference. FASEB Science Research Virtual Conference. Mayo 2021. Oral.

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibin is generated during and protects against murine inflammatory arthritis by reducing angiogenesis

and vasopermeability of the pannus. VASCULATA 2021, North American Vascular Biology Organization Virtual Meeting. Julio 2021. Póster

Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, Salas-Guevara JA, Martínez-Díaz Fernando, de los Ríos EA, Lopez-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Proinflammatory effects and generation of vaso-inhibin in mild murine antigen-induced arthritis. Jornadas Académicas, Instituto de Neurobiología, UNAM. Septiembre 2021. Póster.

13.2 Publicaciones

Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M.G., Wu, Z., García-Rodrigo, J.F., Adan, N., Martínez-Díaz, O.F., de Los Ríos, E.A., López-Barrera, F., de la Escalera, G.M. & Clapp, C. Proinflammatory effects and generation of vasoinhibin in mild murine antigen-induced arthritis. *Endocrinology*. 2022. 163(5).

Clapp, C., **Ortiz, G.**, García-Rodrigo, J.F., Ledesma-Colunga, M.G., Martínez-Díaz, O.F., Adan, N. and Martínez de la Escalera, G. Dual Roles of Prolactin and Vasoinhibin in Inflammatory Arthritis. *Front Endocrinol*. 2022. Aceptado, en proceso de impresión.

Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M. G., Wu, Z., García-Rodrigo, J. F., Adan, N., de la Escalera, G. M. & Clapp, C. Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Lab Invest*, 2020. 100(8): 1068-1079.

Portillo, W., **Ortiz, G.** & Paredes, R. G. Repeated paced mating increases the survival of new neurons in the accessory olfactory bulb. *Front Neurosci*, 14(1): p. 249.

Ledesma-Colunga, M.G., Adan, N., **Ortiz, G.**, Solis-Gutierrez, M., Lopez-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2017. 19(1): p. 93.

13.3 Artículos de investigación derivados de esta tesis