



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Instituto de Neurobiología  
Campus UNAM-Juriquilla, Qro.**

**REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXIDO NÍTRICO  
POR PROLACTINAS: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y  
PROTEÓLISIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A**

**LIBB. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN**

**DIRECTORA DE TESIS  
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ**

Juriquilla, Querétaro

Mayo 2005



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.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Clapp y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi tutora: Dra. Carmen Clapp por sus enseñanzas, apoyo, dedicación e interés constante en mi formación académica.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Alfredo Varela y Dr. Alejandro Zentella por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de mi trabajo doctoral.

A mis sinodales: Dr. Carlos Arámburo, Dra. Carmen Clapp, Dr. Abel Santamaría, Dra Annie Pardo, Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt, Dr. Rolando Hernández y Dr. Alfredo Varela, por sus valiosas críticas y comentarios a la tesis.

Al apoyo académico del Dr. Manuel Aguilar cuya ayuda conceptual y técnica fue fundamental para el progreso de la última fase de mis investigaciones.

Al apoyo técnico y colaboración del Nut. Fernando López Barrera y del M en C. Gabriel Nava. A la asistencia y ayuda de los laboratoristas Daniel Mondragón y Antonio Prado.

A los diversos servicios de apoyo del INB representados por la Lic. Pilar Galarza, la Lic. Lourdes Lara, el M.V.Z. Martín García, el Biól. Exp. Andrés Falcón, el Ing. Alberto Lara, la Dra. Anaid Antaramian, la Lic. Carmen Vásquez, Elsa Ruiz, Ignacio Caballero y Rafael Silva.

Al apoyo editorial de la Dra. Dorothy Pless.

A la ayuda continua siempre eficiente y profesional de la responsable del posgrado, la Quim. Leonor Casanova.

A todos los miembros pasados y presentes de los laboratorios de la Dra. Carmen Clapp y del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por su apoyo constante y por todas las experiencias compartidas.

A mis compañeros y amigos dentro y fuera del INB.

## Dedicatoria

A Yolanda, Javier,  
J. Javier y Vicente.

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
GLOSARIO.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 Prolactina, receptor de PRL y vías de señalización.....	5
1.2 PRL-16K.....	7
1.3 Oxido nítrico.....	10
1.4 Sintetasas de óxido nítrico (NOS).....	11
1.5 Regulación transcripcional de la expresión de iNOS.....	13
1.6 NFkB.....	14
1.7 Proteólisis de PRL hacia PRL-16K.....	17
1.8 Cartílago y condrocitos.....	18
1.9 MMPs.....	19
1.10 PRL y articulación.....	21
<b>2. PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
5.1 Prolactinas y citocinas.....	24
5.2 Anticuerpos.....	24
5.3 Fibroblastos.....	24

5.4	Condrocitos.....	25
5.5	Homogeneizados y medios condicionados de condrocitos.....	25
5.6	Determinación de nitratos y nitritos mediante la reacción de Griess.....	26
5.7	Aislamiento de RNA, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	26
5.8	Northern blot.....	27
5.9	Actividad de la(s) proteasa(s) que generan a la PRL-16K en condrocitos.....	28
5.10	Actividad enzimática de las metaloproteínas.....	28
5.12	Secuenciación de los fragmentos de PRL obtenidos mediante la proteólisis con extractos de condrocitos.....	29
5.13	Proliferación de células endoteliales.....	30
5.14	Vías de señalización.....	30
5.14.1	Fosforilación de STAT-5.....	30
5.14.2	Activación de NFκB.....	31
5.14.3	Degradación de las proteínas IκB.....	32
5.15	Análisis estadístico.....	32
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>33</b>
6.1	La PRL-16K estimula la expresión de NFκB en fibroblastos de pulmón.....	33
6.2	La PRL inhibe la expresión de iNOS estimulada por citocinas.....	39
6.3	Presencia de proteasas neutras de PRL en condrocitos.....	45
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>

## GLOSARIO

PRL	prolactina
PRL-16K	prolactina 16K
IL-1 $\beta$	interleucina-1 beta
IFN- $\gamma$	interferón-gamma
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral-alfa
Cyt	mezcla de citocinas: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
NO	óxido nítrico
iNOS	sintetaza del óxido nítrico tipo inducible
STAT-5	transductor de señal y activador de la transcripción-5
JAK	quinasas Janus
IRF-1	factor regulado por interferón-1
NF $\kappa$ B	factor nuclear kappa B
I $\kappa$ B	inhibidor del factor kappa B
IKK	quinasas de I $\kappa$ B
MMP	metaloproteínas de matriz
CD	catepsina D
bFGF	factor de crecimiento básico de fibroblastos
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial



## ABSTRACT

Prolactin (PRL) is a protein that functions as a hormone and as a cytokine, regulating a wide variety of physiological processes. PRL can be proteolytically cleaved into a 16kDa amino-terminal fragment, known as 16K-PRL. This PRL fragment acts as a potent inhibitor of the formation of new blood vessels (angiogenesis) and as a proinflammatory factor stimulating the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the production of nitric oxide (NO). Conversely, the full length prolactin molecule can stimulate angiogenesis and inhibit NO production induced by proinflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). In the present work, we have investigated the signaling mechanisms that mediate the opposite effects of PRL and 16K-PRL over NO production in cultured fibroblasts. Our results show that proinflammatory cytokines induce the expression of PRL receptors in fibroblasts allowing PRL inhibition of iNOS expression and NO production. This inhibitory effect of PRL involves the activation/phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-5 (STAT-5) and the inhibition of interferon regulatory factor-1, an important transcription factor for iNOS expression. On the other hand, we found that stimulation of iNOS expression and NO production by 16K PRL may involve the activation of NF $\kappa$ B, another important transcription factor for iNOS expression. Finally, because proteolysis of PRL to 16K-PRL determines the direction of hormonal action, we investigated the presence and nature of PRL proteases in cartilage, a tissue devoid of blood vessels where chronic inflammation leads to rheumatoid arthritis. In chondrocytes isolated from cartilage, we found that matrix metalloproteinases (MMPs) can cleave PRL to generate 16K PRL. The cleavage occurs at a neutral pH and involves a consensus site (Ser155-Leu156) in PRL conserved throughout evolution. Altogether, the present findings support the role of PRL molecules as regulators of NO production in inflammatory responses and introduce the cartilage as a putative site where generation of 16K-PRL by metalloproteinases may determine the role of this protein in angiogenesis and inflammation.

## RESUMEN

La prolactina (PRL) es una proteína que funciona como hormona y citocina regulando diversos procesos fisiológicos. Esta hormona puede ser procesada proteolíticamente hacia un fragmento amino terminal de 16kDa (PRL-16K) que actúa como un potente inhibidor de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), y como un agente proinflamatorio capaz de estimular la expresión de la sintetasa del óxido nítrico del tipo inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO) en fibroblastos. En contraste, la PRL puede estimular la angiogénesis e inhibir la expresión de iNOS y la producción de NO inducida por citocinas proinflamatorias. En el presente trabajo investigamos los mecanismos de señalización que median los efectos opuestos de ambas prolactinas sobre la inducción de iNOS y la producción de NO en fibroblastos. Además, dado que el procesamiento de PRL hacia PRL-16K determina la resultante de estos efectos, investigamos la presencia y naturaleza de las proteasas de PRL en el cartílago, un tejido desprovisto de vasos sanguíneos donde la inflamación desencadena padecimientos como la artritis reumatoide. Nuestros resultados muestran que las citocinas proinflamatorias estimulan la expresión del receptor de PRL en fibroblastos en cultivo permitiendo que la PRL inhiba la expresión de iNOS y la producción de NO. Además, observamos que la PRL ejerce este efecto inhibitorio vía la activación/fosforilación del factor de transcripción STAT5 (“signal transducer and activator of transcription-5”) y la inhibición de IRF-1 (“interferon regulatory factor-1”), un factor de transcripción para iNOS. Por otra parte, encontramos que la PRL-16K induce la activación del factor de transcripción NFκB, determinante de la expresión de iNOS, lo que sugiere que la PRL-16K estimula la expresión de iNOS y la producción de NO a través de activar al NFκB. Finalmente, mostramos que proteasas de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) pueden cortar a la PRL para generar PRL-16K en condrocitos aislados del cartílago, en una secuencia consenso (Ser155-Leu156) de la PRL, la cual se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva. En conjunto, los presentes hallazgos apoyan el papel de las moléculas de PRL como reguladores de la producción de NO en respuestas inflamatorias e introducen al cartílago como un sitio probable donde la generación de PRL-16K por MMPs puede determinar el papel de esta proteína en la angiogénesis y la inflamación.

## 1. INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) es una proteína que actúa como hormona y citocina regulando diversas funciones dentro de la reproducción, la osmorregulación, la respuesta inmune y la formación de nuevos capilares sanguíneos (angiogénesis), entre otras (Ben-Jonathan et al.,, 1996). Esta diversidad funcional parece depender de la producción y acción de la PRL sobre distintos tipos celulares, de la heterogeneidad molecular de sus receptores acoplados a diversas vías de señalización, así como de la modificación de la hormona hacia variantes moleculares con diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, el fragmento amino-terminal de 16kDa de la PRL o PRL-16K inhibe la angiogénesis mientras que la PRL completa puede estimular este proceso. Asimismo, la PRL-16K estimula y la PRL inhibe la producción de óxido nítrico (NO), un importante mediador inflamatorio. Estas acciones opuestas involucran la activación de receptores específicos para ambas PRLs en células del endotelio vascular así como en fibroblastos. Por otra parte, la posibilidad de que la PRL y la PRL-16K regulen de manera diferencial la angiogénesis y la inflamación, sugiere la posible generación de ambas proteínas en aquellos tejidos donde el control de estos procesos es indispensable para su función. Por ejemplo, en el cartílago que es un tejido avascular donde la formación de nuevos vasos sanguíneos determina procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide.

En esta tesis, revisamos información en torno a aspectos generales de la fisiología de la PRL y sus acciones sobre la angiogénesis y la inflamación. Asimismo, con el propósito de entender mejor la participación de la PRL en estos procesos, investigamos experimentalmente las vías de señalización que utilizan tanto la PRL como la PRL 16K para inhibir y estimular, respectivamente, la producción de NO en fibroblastos de pulmón. Además, dado que el cartílago puede representar un blanco de los efectos antiangiogénicos y proinflamatorios de la PRL-16K, investigamos la presencia e identidad de proteasas capaces de generar a este fragmento de la PRL en condrocitos aislados del cartílago.

## 1.1 PRL, receptor de PRL y vías de señalización

La prolactina es una hormona peptídica secretada por la glándula pituitaria anterior cuyo nombre se deriva de su acción sobre la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, además de sus efectos sobre la lactancia, la prolactina ejerce más de 300 efectos diferentes que se incluyen dentro de la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, la respuesta inmune y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996).

La prolactina se origina a partir de un solo gen que se encuentra presente en todos los vertebrados y que da origen a una proteína madura de 200 amino ácidos con una masa molecular de 23 kDa (Ben-Jonathan et al., 1996, Bole-Feysot et al., 1998). Debido a similitudes en la estructura de la hormona y de sus receptores, la PRL se ha integrado a la familia de las citocinas hematopoyéticas, que incluye al factor estimulador de colonias, a las interleucinas-2, 4 y 5, y a hormonas lactogénicas como la hormona de crecimiento, y el lactógeno placentario, entre otras (Horseman and Yu-Lee 1994). Los ligandos de esta familia presentan como motivo estructural característico una organización en cuatro 4  $\alpha$ -hélices antiparalelas (Goffin et al., 1996). Por otra parte, los receptores de esta familia de citocinas se caracterizan por tener dos puentes disulfuro y una secuencia Trp-Ser-X-Trp-Ser en el dominio extracelular conocida como motivo WS, que es importante para su interacción con el ligando (Horseman y Yu-Lee 1994).

Con respecto al receptor de PRL se han identificado al menos tres isoformas que resultan del procesamiento alternativo del RNA mensajero (Boutin et al., 1988, Davis y Linzer 1989). El dominio de unión a ligando es idéntico en todas las isoformas y la diferencia entre los receptores reside en la extensión del dominio intracitoplásmico, y que por lo tanto los define como corto (42kDa), intermedio (65kDa) y largo (80kDa). El receptor de PRL se expresa prácticamente en todos los tipos celulares donde se ha analizado; sin embargo, su función es aún poco conocida en muchos tejidos. Además, en algunos de ellos el nivel de expresión del receptor de

PRL es muy bajo y se desconoce si un aumento en su expresión puede ser un factor determinante para su función. (Nagano y Kelly 1994).

El receptor de PRL es activado por PRL, lactógenos placentarios de las diferentes especies y por la hormona de crecimiento, exclusivamente de la especie humana. La activación de este receptor ocurre a través de la unión de una molécula de ligando a dos moléculas de receptor (dimerización), y por lo tanto esta interacción involucra dos regiones diferentes del ligando que interaccionan cada una con una molécula diferente de receptor. El proceso de dimerización inicia una cascada de eventos intracelulares. El receptor de PRL carece de actividad enzimática y la transducción de la señal ocurre mediante su asociación con diferentes cinasas, que a su vez activan a las moléculas efectoras. La vía de señalización mas importante activada por el receptor de PRL es la vía JAK/STAT (“Janus kinases”/”signal transducer and activator of transcription”). La dimerización del receptor de PRL induce la transfosforilación/activación de las cinasas de tirosina JAK2 que se encuentran normalmente asociadas a cada molécula del receptor. Las JAK2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor lo que origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son fosforiladas por las JAK2. Una vez fosforiladas, las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que se translocan al núcleo, se unen a secuencias consenso en el DNA denominadas GAS (interferon- $\gamma$  activation sequence) y activan la transcripción génica (Bole-Feysot et al., 1998). Las proteínas STAT activadas por PRL son tres: STAT-1 que en respuesta a PRL estimula la transcripción del gen de IRF-1 (“interferon regulatory factor-1”) en células hematopoiéticas; STAT-3 que es activada en respuesta a PRL pero aún se desconocen sus genes blanco; y STAT-5, que en el epitelio mamario induce la expresión de los genes de  $\beta$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina, etc (Yu-Lee 1997). Además de la vía JAK/STAT la prolactina activa otras vías de señalización como son: la vía Ras-Raf-MAPK, la vía de las cinasas de tirosina que incluyen a Src y a Tec, la vía PI3K-Akt y la fosfatasa de tirosina SHP-2, entre otras (Bole-Feysot et al., 1998, Clevenger et al., 2003).

Los receptores de PRL pueden activarse también en respuesta a otras variantes moleculares de la hormona (Sinha 1995). En su mayor parte las isoformas de PRL son generadas por modificaciones postraduccionales del tipo de la fosforilación, glicosilación y proteólisis (Sinha 1995). Sin embargo, estas modificaciones postraduccionales suelen reducir la afinidad por el receptor y la actividad biológica de las isoformas de prolactina. Así, la fosforilación puede generar antagonistas de la hormona (Wang y Walker 1993), mientras que la glicosilación (Hoffman et al., 1993) y la proteólisis (Anthony et al., 1993, Clapp et al., 1989) se traducen en variantes de PRL con una menor actividad hormonal mitogénica y lactogénica. Si bien el procesamiento proteolítico de la PRL hacia su fragmento de 16kDa resulta en una actividad reducida en los bioensayos clásicos para PRL, esta variante molecular ha despertado gran interés debido a que posee efectos distintos a los de la PRL íntegra, lo que implica la activación de nuevos receptores (Corbacho et al., 2002).

## **1.2 PRL-16K**

La PRL-16K fue identificada hace más de 15 años como el fragmento amino-terminal de 16kDa de la prolactina generado por la proteólisis de la hormona por extractos de glándula mamaria en condiciones ácidas (Clapp 1987, Clapp et al., 1988). Más tarde se identificó que el corte de la PRL ocurría entre los aminoácidos Tyr 145 y Leu 146 y Trp 148 y Ser 149, de manera que la pérdida del tripéptido 146-148 y la reducción del puente disulfuro intermedio de la molécula, cortaban a la PRL en un fragmento amino-terminal de 16kDa y en otro carboxilo terminal de 6kDa (Fig.1) (Balocchi et al., 1993, Andries et al., 1992). Por medio de Western blots, con anticuerpos dirigidos contra el extremo amino-terminal de la molécula se ha detectado a la PRL-16K en la hipófisis (Torner et al., 1995) y en el suero en la rata (Sinha et al., 1985), así como en tejidos periféricos que incluyen al endotelio vascular (Corbacho et al., 2000a) y a los fibroblastos (Corbacho et al., 2000b).

Aunque la PRL 16K funciona como un agonista parcial de la PRL (Clapp et al., 1989), su relevancia funcional radica principalmente en que ejerce efectos distintos e incluso antagónicos a los de la PRL. Estos efectos incluyen la inhibición de la angiogénesis (Corbacho et al., 2002) y la estimulación de la expresión de la sintetasa inducible del óxido nítrico y la producción de óxido nítrico (Corbacho et al., 2000b).

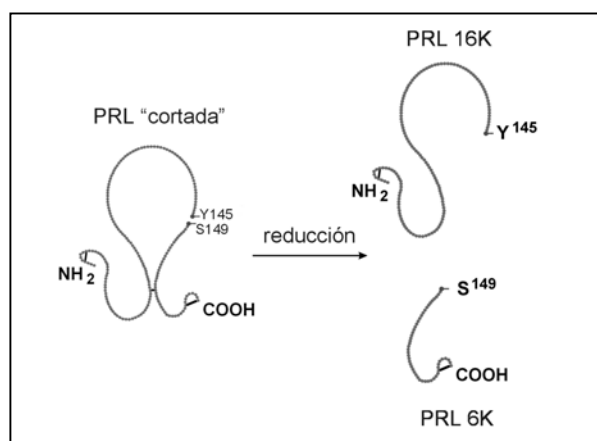


Fig.1 Esquema que representa a la PRL "cortada" que tras la reducción del puente disulfuro intermedio da lugar a los fragmentos de 16kDa y 6kDa.

La PRL-16K inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, a través de acciones diversas sobre el endotelio vascular. Así, la PRL-16K inhibe la proliferación basal de las células endoteliales y la proliferación estimulada por factores de crecimiento como el VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) y el bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) (Clapp et al., 1993). La PRL-16K también inhibe la organización de células endoteliales en estructuras capilares cuando se les cultiva en geles de colágena I (Clapp et al., 1993). Dicha organización depende de la producción de proteasas capaces de promover la degradación de la matriz extracelular endotelial. Entre estas proteasas, se incluye el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) (Pepper et al., 1987). La PRL-16K inhibe la actividad del uPA a través de estimular la expresión del PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1) (Lee et al., 1998, Struman et al., 1999).

Finalmente, la PRL-16K es capaz de estimular la apoptosis de células endoteliales a través de activar la vía de las caspasas e inducir la conversión del factor Bcl-X, de su forma antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> a su forma proapoptótica Bcl-X<sub>S</sub> (Martini et al., 2000).

La actividad antiangiogénica de la PRL-16K se ha validado también en ensayos *in vivo*, como el de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Clapp et al., 1993), y el de la córnea de la rata (Dueñas et al., 1999). Además, la transfección con vectores de expresión para PRL-16K de células de cáncer de próstata y de colon redujo significativamente la habilidad de ambos tipos celulares de formar tumores en ratones inmunosuprimidos (Bentzien et al., 2001, Kim et al., 2003), resultados que han permitido proponer a la PRL-16K como un posible factor terapéutico para el tratamiento de patologías dependientes de la angiogénesis.

El hecho de que la PRL-16K, pero no la PRL, inhibe la angiogénesis sugiere que los efectos de la PRL-16K pueden ser mediados por un receptor distinto al receptor de la PRL. En apoyo a esta posibilidad, ensayos de unión a ligando mostraron que las células endoteliales contienen sitios de unión saturables y de alta afinidad para la PRL-16K (Clapp y Weiner 1992) que no interactúan con la PRL, y que podrían representar los receptores que median los efectos antiangiogénicos de este fragmento de PRL. Sin embargo, el receptor para la PRL-16K no se ha identificado y poco se sabe sobre su mecanismo de señalización. Al respecto, se ha mostrado que el efecto inhibitorio ejercido por la PRL-16K sobre la proliferación de las células endoteliales estimulada por bFGF y VEGF ocurre a través de inhibir la activación de Ras en la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (D'Angelo et al., 1995, 1999). También se ha mostrado que la PRL-16K estimula la apoptosis del endotelio vía la activación del NFκB (factor nuclear kappa B) y la subsecuente activación de la vía de las caspasas (Tabruyn et al., 2003).

Mientras que los efectos antiangiogénicos de la PRL-16K están bien documentados, el papel de la PRL en la angiogénesis es poco conocido. Si bien es claro que la PRL no inhibe la angiogénesis, se ha reportado que puede estimular



dicho proceso en el modelo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Struman et al., 1999). Sin embargo, este efecto aún es controversial como también si la PRL tiene acciones directas sobre las células endoteliales. La mayor parte de los estudios no han logrado detectar el receptor de PRL en las células endoteliales, si bien existe un estudio en el que se reportó la presencia de este receptor en células endoteliales de la arteria pulmonar y su activación se asoció con efectos sobre la organización del citoesqueleto (Merkle et al., 2000).

Por otra parte, al igual que la PRL, la PRL-16K parece regular la función de diversos tipos celulares. En un estudio reciente, se mostró que la PRL-16K puede estimular la producción de altas concentraciones de NO en fibroblastos de pulmón fetal en cultivo (Corbacho et al., 2000b), y que estas células también expresan sitios de unión para este fragmento hormonal (Corbacho et al., 2000b). Al parecer en los fibroblastos como en el endotelio vascular, el efecto de la PRL es contrario al de la PRL-16K. La PRL inhibe la producción de NO inducida por citocinas proinflamatorias y no modifica la producción basal de NO (Corbacho et al., 2003).

Como se discute a continuación, es posible proponer que la implicación funcional de los efectos de las PRLs sobre el NO se podrían relacionar con el proceso inflamatorio.

### **1.3 Óxido nítrico**

Hace casi 25 años, se reportó que la relajación de los vasos sanguíneos en respuesta a acetilcolina requería del endotelio intacto (Furchgott y Zawadzki 1980) y años después se determinó que el factor relajante derivado del endotelio era el NO (Ignarro et al., 1987, Palmer et al., 1987). Hoy en día, se sabe que el NO es producido por múltiples tipos celulares y que es una importante molécula señalizadora involucrada, además de en la vasodilatación, en la regulación de diversos mecanismos fisiológicos y patológicos del sistema cardiovascular, el sistema nervioso y el sistema inmune (Mayer y Hemmens 1997, Wink y Mitchell 1998).

El óxido nítrico es un radical libre en estado gaseoso que puede difundir libremente a través de la célula. Se produce mediante la oxidación de la L-arginina a citrulina en presencia de NADPH y O<sub>2</sub> por las sintetasas del óxido nítrico (NOS) (Eiserich et al., 1998) y tiene un tiempo de vida muy corto debido a su rápida oxidación hacia los metabolitos estables e inactivos nitritos y nitratos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

En general se piensa que cuando el óxido nítrico se produce en cantidades picomolares o nanomolares, regula procesos fisiológicos como la permeabilidad y el tono vascular, la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio, la función renal y la neurotransmisión. Por otra parte, la producción de NO en concentraciones micromolares generalmente ocurre asociada a reacciones inflamatorias y puede desencadenar eventos patológicos (Eiserich et al., 1998). La producción de grandes cantidades de NO por macrófagos tiene potentes efectos antimicrobianos, y también puede actuar inhibiendo el crecimiento de parásitos (Eiserich et al., 1998). Sin embargo, los efectos citotóxicos del NO también pueden ocurrir en las células del propio organismo y se han asociado a lesiones producidas durante reacciones inflamatorias crónicas, en enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y en el cáncer (Eiserich et al., 1998). El mecanismo de estas acciones citotóxicas puede incluir la inhibición de la división celular, la inhibición de la cadena respiratoria y la citotoxicidad indirecta por la formación de otros radicales libres altamente reactivos (Eiserich et al., 1999).

#### **1.4 Sintetasas de óxido nítrico (NOS)**

Se han descrito hasta el momento tres tipos de NOS que son producto de genes distintos y que comparten una similitud en su secuencia de aminoácidos del 50-60 %. La NOS neuronal (nNOS o NOS 1) se expresa principalmente en neuronas y glia, pero también está presente en células del riñón, células β-pancreáticas, del músculo esquelético, y en epitelios de pulmón, estómago y útero. El NO producido por la nNOS funciona principalmente como neurotransmisor, pero también en la regulación del tono muscular en el tracto gastrointestinal y en el músculo esquelético.

Esta enzima es de expresión constitutiva y su actividad es dependiente de calcio/calmodulina, produciendo concentraciones picomolares de NO (Nathan y Xie 1994, Geller y Billiar 1998).

La NOS endotelial (eNOS o NOS 3) se produce principalmente en el endotelio y funciona para mantener la homeostasis vascular, a través de regular la presión sanguínea y prevenir la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio. La eNOS también se expresa de manera constitutiva, siendo su actividad dependiente de calcio/calmodulina, y produce concentraciones nanomolares de NO (Nathan y Xie 1994, Geller y Billiar 1998).

Finalmente, la NOS inducible (iNOS o NOS 2) que, como su nombre lo indica, es inducida en casi todos los tipos celulares de mamíferos por lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano y citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). A diferencia de las otras isoformas, la iNOS tiene una afinidad muy alta por el complejo calcio/calmodulina de manera que se considera constitutivamente activa y su regulación ocurre principalmente a nivel transcripcional. Produce concentraciones micromolares de NO (Nathan y Xie 1994, Geller y Billiar 1998, Aktan 2004) que son determinantes en procesos infecciosos e inflamatorios.

La regulación de las NOS es compleja y difiere entre las diferentes isoformas. El dogma central indica que la actividad de las NOS constitutivas nNOS y eNOS está regulada por cambios en los niveles de calcio intracelular, mientras que la iNOS se regula a nivel transcripcional. Sin embargo existen excepciones; por ejemplo, para que la eNOS sea completamente activa es necesaria la inducción por citocinas de una enzima que genera a la tetrahidrobiopterina, un cofactor esencial para la actividad de eNOS. Por otra parte, la iNOS también puede ser expresada de manera constitutiva en ciertos tipos celulares. Además, la actividad de las NOS esta regulada a su vez por mecanismos post-traduccionales como son: Estabilidad de la proteína, dimerización,

fosforilación, localización subcelular, unión a cofactores, y disponibilidad de los sustratos (Geller y Billiar 1998).

El hecho de que la PRL y la PRL-16K regulen la producción de NO vía la expresión de iNOS y, por otra parte, que la actividad de iNOS se encuentre íntimamente ligada con las reacciones inflamatorias, sugiere que las prolactinas podrían actuar como moduladoras del proceso inflamatorio. Para entender esta posible acción de las PRLs, creemos que es importante investigar el mecanismo(s) que media las acciones opuestas de la PRL-16K y de la PRL sobre la expresión de iNOS.

### **1.5 Regulación transcripcional de la expresión de iNOS**

La regulación transcripcional de iNOS se ha estudiado ampliamente. La clonación de los promotores de rata, ratón y humano ha permitido identificar las secuencias consenso en el DNA que permiten la unión a los diferentes factores de transcripción. Los promotores de iNOS de las especies analizadas (rata, ratón y humano) comparten un 65% de similitud, y los elementos de respuesta en el DNA son prácticamente los mismos para las distintas especies, aunque se presentan variaciones en el número y la posición de los mismos. En la tabla 1 se muestran los elementos que componen el promotor de iNOS, los factores de transcripción que los activan y que se ha demostrado son importantes para la expresión de la enzima, así como los estímulos que inducen la activación de dichos factores transcripcionales (Keinanen et al., 1999, Chu et al., 1998, Galea y Feinstein 1999). Para que la expresión de iNOS sea máxima, es necesario que se activen varios factores de transcripción, a esto se debe el que la combinación de las citocinas proinflamatorias IL1- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$  produzca una estimulación máxima, mientras que el tratamiento con una sola o dos de las citocinas no tenga ningún efecto o tenga un efecto menor (Chu et al., 1998).

**Tabla 1. Regulación transcripcional de iNOS**

Sitio de unión en el DNA	Factor de Transcripción	Estímulo
$\gamma$ -IRE	IRF-1	IFN- $\gamma$
NF $\kappa$ B	NF $\kappa$ B	TNF- $\alpha$ IL1- $\beta$ LPS
GAS	STAT-1	IFN- $\gamma$
AP1	Fos/Jun	TNF- $\alpha$ IL1- $\beta$
C/EBP	C/EBP	IFN- $\gamma$ TNF- $\alpha$ IL1- $\beta$
CRE	CREB	IL1- $\beta$ cAMP
HRE	HIF1	Hipoxia

Abreviaturas:  $\gamma$ -IRE: IFN $\gamma$  Responsive Element, GAS: IFN $\gamma$  Activation Sequence, AP-1: Activator Protein-1, C/EBP: CCAAT enhancer-binding protein, CRE: cAMP Response Element, HRE: hipoxia response element, CREB: CRE binding protein, NF $\kappa$ B: Nuclear Factor kappa B.

## 1.6 NF $\kappa$ B

El factor de transcripción que se considera más importante para estimular la expresión de iNOS es el NF $\kappa$ B, ya que se ha demostrado que es indispensable aunque no suficiente para que se induzca la transcripción de la enzima (Xie et al., 1994).

NF $\kappa$ B es el nombre dado a los factores de transcripción dimericos pertenecientes a la familia Rel de proteínas de unión al DNA, los cuales reconocen una secuencia consenso común. NF $\kappa$ B se encuentra esencialmente en todos los tipos

celulares y está involucrado en la activación de genes múltiples en respuesta a infecciones, inflamación y otras condiciones de estrés celular, las cuales requieren de cambios rápidos en la expresión génica (Karin y Ben-Neriah 2000).

El NF $\kappa$ B se encuentra normalmente en forma inactiva secuestrado en el citoplasma de las células no estimuladas y necesita ser translocado al núcleo para ser activo. La localización subcelular del NF $\kappa$ B está controlada por una familia de proteínas inhibidoras, las I $\kappa$ Bs (inhibidores de NF $\kappa$ B) que se unen al NF $\kappa$ B bloqueando la secuencia de localización nuclear y de esta manera inhiben su actividad. La exposición de las células a una variedad de estímulos extracelulares, conlleva a la activación del complejo de proteínas cinasas de I $\kappa$ B (IKK), que fosforilan a las proteínas I $\kappa$ B, e inducen su ubiquitinación y degradación vía el proteosoma, lo que permite que el NF $\kappa$ B libre se transloque al núcleo y active la transcripción de genes como el de iNOS (Karin y Ben-Neriah 2000).

En mamíferos se han identificado 5 proteínas de la familia NF $\kappa$ B/Rel, NF $\kappa$ B 1 (p50 y su precursor p 105), NF $\kappa$ B 2 (p52 y su precursor p100), c-Rel, Rel A (p65), y Rel B. Todas estas proteínas difieren en su habilidad para activar la transcripción y solamente Rel A/p65 y c-Rel contienen dominios de activación transcripcional. El dímero inicialmente identificado y que es el más abundante en todos los tipos celulares es el formado por p65 y p50 (Karin y Ben-Neriah 2000).

La familia de las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B está formada por I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, el precursor de NF $\kappa$ B1 (p105) y de NF $\kappa$ B2 (p100). Sin embargo las más importantes reguladoras de la actividad de NF $\kappa$ B en mamíferos son I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . Además de impedir la migración al núcleo, las proteínas I $\kappa$ B también son importantes para frenar la actividad de NF $\kappa$ B, ya que cuando I $\kappa$ B $\alpha$  es sintetizada *de novo*, entra al núcleo y se une a NF $\kappa$ B, determinando su disociación del DNA (por tener una mayor afinidad por I $\kappa$ B $\alpha$  que por el DNA) y su transporte al citoplasma a

través de una secuencia de exportación nuclear presente en la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (Whiteside e Israel 1997).

### **1.7 Proteólisis de PRL hacia PRL-16K**

Aunque la PRL-16K se ha identificado en varios tejidos y fluidos corporales (Corbacho et al., 2002), la enzima responsable de su generación no está claramente identificada. Distintas evidencias sugieren que una de las enzimas responsables de procesar a la PRL hacia la PRL-16K podría ser la enzima lisosomal de aspártico catepsina-D (CD). Muchos estudios han demostrado que extractos ácidos de diversos órganos blanco de la PRL (glándula mamaria, próstata, hígado, riñón, etc), cortan a la PRL y generan a la PRL-16K (Compton y Witorsch 1984, Clapp 1987, Baldocchi et al., 1992). En 1992, Andries demostró que células de la hipófisis anterior de la rata contienen una PRL cortada, cuyo corte ocurre entre los aa 145-146 y 148-149 (Andries et al., 1992). Más tarde el grupo de Nicoll mostró que la CD corta a la PRL de rata entre los aa 145-149 y que el procesamiento de la hormona por extractos ácidos de la glándula mamaria se bloquea en presencia de pepstatina A, un inhibidor de la actividad de CD (Baldocchi et al., 1993). Este hallazgo es consistente con todos los estudios previos que muestran que el corte de la PRL depende de un pH ácido (3-5) (Clapp 1987, Kurana et al., 1999), que es el pH de acción de la CD (Rocheffort et al., 2000).

Por todo esto, se propuso como muy probable que la CD es la enzima responsable de generar a la PRL-16K. Sin embargo, tal propuesta tiene varias limitaciones conceptuales para ubicar el significado funcional de la PRL-16K. La CD es una enzima lisosomal y por lo tanto de expresión constitutiva y ubicua, lo que hace difícil proponer el que su regulación tenga lugar y por lo tanto pudiera ser un factor determinante para la generación de PRL-16K. Sin embargo, evidencias recientes muestran que estímulos como los estrógenos (Wang et al., 2001) y la hipoxia (Cosío et al., 2004) pueden regular la expresión o actividad de CD, y que por lo tanto esta enzima puede representar un blanco para el control de la producción de

la PRL-16K. Otro problema es el pH de acción de la CD, que al ser tan ácido limita la generación de la PRL-16K a los compartimientos lisosomales. Sin embargo, la CD también puede ser secretada por diversos tipos celulares y actuar en el medio extracelular en condiciones ácidas, por ejemplo en el tejido inflamado (Griffiths 1991) y en el microambiente tumoral (Rocheffort 1990). Al respecto, es interesante mencionar que la CD secretada por células tumorales puede cortar al plasminógeno hacia angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis (Morikawa et al., 2000).

Quizá la mayor objeción para considerar a la CD como la proteasa responsable de generar a la PRL 16K endógenamente se deriva de la observación de que el sitio de corte para CD detectado en la PRL de rata, no está presente en la PRL humana y esta hormona es refractaria al procesamiento mediado por la CD (Kurana et al., 1999). Recientemente el grupo de Goffin, aumentando la sensibilidad de detección del método para revelar la proteólisis de la PRL, mostró que la CD sí procesa a la PRL humana, aunque con una eficiencia mucho menor y genera múltiples fragmentos de 11, 15, 16 y 17kDa, todos ellos con propiedades antiangiogénicas (Piwnica et al., 2004).

Si bien estos hallazgos refuerzan la posible participación de la CD como proteasa responsable de generar a la PRL 16K, la dependencia de un pH sumamente ácido (3-5) para su acción, ha hecho que investigadores analicen la participación de enzimas neutras en dicho procesamiento. Así, en 1999 el grupo de Ben-Jonathan describió que la trombina puede cortar tanto a la PRL de rata como a la PRL humana y generar un fragmento de 16kDa. Sin embargo, el corte por trombina ocurre entre los aa 53-54 de la hormona, por lo que el fragmento que se genera corresponde al extremo carboxilo terminal de la PRL y se observó que este fragmento no tiene efecto inhibitorio sobre la angiogénesis (Kurana et al., 1999). Estos hallazgos sugirieron que la presencia de fragmentos inmunorreactivos de 16kDa en los distintos tejidos y fluidos corporales, no es evidencia suficiente de la presencia endógena de la PRL-16K antiangiogénica y que dichos fragmentos deben ser



caracterizados con metodologías capaces de identificar su naturaleza amino- o carboxilo-terminal.

La acción antiangiogénica de la PRL-16K sugiere que su producción puede aumentar en tejidos avasculares. Al respecto, estudios de nuestro laboratorio mostraron que la córnea, que es un tejido avascular, expresa el mRNA de PRL y contiene una PRL-16K amino-terminal (Dueñas et al., 1999a). Además, anticuerpos anti-PRL capaces de inmunoneutralizar a la PRL-16K introducidos en la córnea, producen una respuesta angiogénica local (Dueñas et al., 1999b). Otro tejido avascular en el que hemos detectado la expresión de PRL es el cartílago. De manera que tanto la córnea como el cartílago podrían ser fuentes ricas en proteasas capaces de generar a la PRL-16K.

## **1.8 Cartílago y condrocitos**

El cartílago es un tejido conjuntivo especializado, constituido por un solo tipo celular, los condrocitos. Estas células son responsables de formar y recambiar la matriz extracelular del cartílago, que se compone principalmente de agua, colágena tipo-2, y proteoglicanos. A diferencia de otros tejidos conjuntivos, el cartílago carece de vasos sanguíneos y nervios. Las funciones del cartílago son diversas: durante el desarrollo provee soporte estructural y sirve de guía para el crecimiento de los huesos, permite la función articular a través de absorber la presión mecánica, evita la fricción y permitir el movimiento. El cartílago también participa en la reparación de fracturas.

El cartílago normal es un tejido avascular, a pesar de que está expuesto a muchos factores angiogénicos durante el proceso de osificación o crecimiento de los huesos, proceso en el cual el cartílago es reemplazado por tejido óseo que es uno de los tejidos mas vascularizados del cuerpo de los vertebrados (Vu et al., 1998). La osificación ocurre en la llamada placa de crecimiento en los extremos o epífisis de los huesos largos. Durante este proceso, la placa de crecimiento epifisaria experimenta

una transformación en la morfología celular. De tal manera, que una región de condrocitos quiescentes o de reserva, se diferencia en una zona de condrocitos en proliferación que después se vuelven hipertróficos hasta que finalmente experimentan muerte por apoptosis, y son reemplazados por matriz ósea (principalmente fosfato de calcio y colágeno) y osteoblastos. El resultado de este proceso es el alargamiento del hueso, mientras que el grosor de la placa de crecimiento permanece relativamente constante. Dicha secuencia de eventos recae en el equilibrio preciso entre la condrogénesis (producción de cartílago) y la osteogénesis (formación de hueso) (Gerber et al., 1999).

La angiogénesis es un proceso indispensable para la osificación, ya que permite la invasión del cartílago por el hueso. El cartílago hipertrófico es invadido por vasos sanguíneos con lo que se induce la muerte de los condrocitos mediante el proceso de apoptosis, esto ocurre gracias a que cuando los condrocitos se diferencian hacia células hipertróficas dejan de producir factores inhibidores de la angiogénesis y producen factores angiogénicos como el VEGF (Descalzi Cancedda et al., 1995, Gerber et al., 1999). De manera que la supervivencia del cartílago depende de un balance entre la acción de factores estimuladores de la angiogénesis y de factores antiangiogénicos, estos últimos siendo mas relevantes en el adulto cuando el desarrollo del hueso ha finalizado. Entre los factores antiangiogénicos producidos por los condrocitos se encuentran la condromodulina I (Hiraki et al., 1997) y la endostatina (Pufe et al., 2004).

Además de los factores reguladores de la angiogénesis, otras moléculas importantes en la homeostasis del cartílago son las metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales además de regular la degradación y el recambio de los componentes de la matriz extracelular, regulan la apoptosis, la migración celular y la invasión del cartílago durante la formación del hueso (Sternlicht y Werb 2001).

## **1.9 MMPs**

Las MMPs son enzimas proteolíticas que requieren de zinc y calcio para su actividad y pueden actuar a pH neutro. Estas enzimas cortan proteínas de la matriz extracelular (colágena, laminina, fibronectina, etc), así como otros sustratos que no son constitutivos de la matriz (proteasas, factores de crecimiento, receptores de membrana, citocinas, etc). Las MMPs participan en procesos fisiológicos como la remodelación y desarrollo de los tejidos durante el desarrollo embrionario, la reparación de heridas, la ovulación, la remodelación ósea, la función de células inmunes (macrófagos y neutrófilos), etc. También desempeñan un papel importante bajo condiciones patológicas donde su sobreproducción conlleva a una destrucción aberrante del tejido conjuntivo en padecimientos como la úlcera gástrica, el asma, la arterioesclerosis, la osteoartritis, la artritis reumatoide y la metástasis de células tumorales (Kelly y Jarjour 2003, Yoon et al., 2003, Vincenti y Brinckerhoff 2002).

Las MMPs son muy similares en su estructura pero difieren en la especificidad por el sustrato. La familia de las MMPs se divide en: colagenasas 1, 2 y 3 (MMP-1, MMP-8 y MMP-13 respectivamente), estromelisinias 1, 2 y 3 (MMP-3, MMP-10 y MMP-11 respectivamente), gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente), matrilisina (MMP-7), y elastasa de macrófagos (MMP-12), y MMPs de membrana (MT-MMP) 1, 2, 3 y 4 (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-17 respectivamente) (Nagase y Woessner 1999). Las MMPs tienen afinidad proteolítica por todos los componentes de la matriz extracelular del cartílago, incluyendo a los proteoglicanos, las colágenas, las glicoproteínas, etc.

Diversos grupos de investigación han reportado que las MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 9, y 13, se encuentran elevadas en el cartílago de pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide (Chubinskaya et al., 1999, Yoshihara et al., 2000, Ohta S et al., 1998, Shlopov et al., 1997, Freemont et al., 1997, Mohtal et al., 1993, Tsuchiya et al., 1997, Nguyen et al., 1992, Vincenti y Brinckerhoff 2002). Sin embargo, también se ha reportado que la expresión de la MMP-3 se encuentra reducida en el cartílago de pacientes con osteoartritis en las etapas tardías de la enfermedad en comparación con el cartílago normal (Kevorkian et al., 2004); e incluso algunos estudios no han

encontrado diferencias en la expresión de las MMPs 1, 2 y 13 (Chubinskaya et al., 1999, Vincenti y Brinckerhoff 2002). A pesar de ello, de manera general se acepta que un incremento en la expresión de las MMPs en la articulación se traduce en un daño al cartílago y por lo tanto en una situación patológica (Chubinskaya et al., 1999).

### **1.10 PRL y articulación**

La PRL podría participar en el desarrollo del cartílago ya que se ha reportado la expresión del receptor de PRL en el cartílago murino y humano durante la gestación (Tzeng y Linzer 1997, Freemark et al., 1997). Además, la PRL se expresa en células madre derivadas de la médula ósea, cuando se induce su diferenciación a condrocitos. En estas condiciones, la prolactina estimula la producción de colágena tipo-2, de proteoglicanos, y su propia expresión (Ogueta et al., 2002). Además, la PRL en combinación con glucocorticoides induce la organización de los condrocitos en columnas longitudinales y por lo tanto la posible formación y reparación del cartílago y el hueso (Ogueta et al., 2002).

Por otra parte, la PRL se ha asociado también con procesos patológicos de la articulación. Se han reportado niveles altos de PRL en el suero de pacientes con artritis reumatoide (AR) (Mateo et al., 1998, Serio et al., 2002). También se ha encontrado que el tejido sinovial de los pacientes con AR expresa el RNA mensajero de la PRL (Nagafuchi et al., 1999); que la PRL está presente en el líquido sinovial de pacientes con sinovitis y AR (Ogueta et al., 2002), y que el receptor de PRL se expresa en el cartílago de pacientes con osteoartrósis (Ogueta et al., 2002). Más aún, la hiperprolactinemia podría participar en el daño articular. La PRL induce la proliferación de células sinoviales de pacientes con AR, y esta hormona actúa sobre tipos celulares de la articulación artrítica estimulando la producción de citocinas (interleucina 6 e interleucina 8) y de la MMP-3, además de inhibir la producción del inhibidor de metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1) (Nagafuchi et al., 1999).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De acuerdo a los antecedentes mencionados es claro que la PRL y la PRL-16K constituyen factores capaces de regular la angiogénesis y las reacciones inflamatorias mediadas por el NO. Dado que los efectos de ambas moléculas sobre estos procesos son opuestos, parece evidente que la resultante final de sus acciones podría estar determinada por la activación de diferentes receptores y vías de señalización sobre las mismas células blanco, pero también por la activación de la proteasa capaz de procesar a la PRL hacia PRL-16K.

En el presente trabajo nos propusimos investigar las vías de señalización utilizadas por la PRL-16K y la PRL en los fibroblastos de pulmón para estimular e inhibir la expresión de iNOS y la producción de NO, respectivamente. Además, investigamos si las citocinas proinflamatorias pueden regular la expresión del receptor de PRL en estas células.

Por último, con el fin de analizar el procesamiento de PRL hacia PRL-16K, utilizamos como modelo a los condrocitos ya que constituyen un tejido avascular que sufre procesos inflamatorios que involucran a la angiogénesis en enfermedades como la artritis reumatoide. Analizamos si MMPs presentes en condrocitos pueden procesar a la PRL hacia PRL-16K. Nuestras hipótesis fueron las siguientes:

## **3. HIPÓTESIS**

### **Parte 1. Vías de señalización activadas por PRLs en fibroblastos**

- a) La PRL-16K estimula la expresión de iNOS y la producción de NO a través de activar al NFκB.
- b) La PRL inhibe la expresión de iNOS y la producción de NO a través de activar/fosforilar a STAT-5 y de inhibir la expresión de IRF-1.

- c) Las citocinas proinflamatorias ( $IL1\beta$ ,  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ ) regulan la expresión del receptor de PRL.

## **Parte 2. Proteasas de PRL en el cartílago**

MMPs presentes en condrocitos procesan proteolíticamente a la PRL hacia la PRL-16K antiangiogénica.

## **4. OBJETIVOS**

### **Parte 1. En cultivos primarios de fibroblastos de pulmón fetal:**

1. Determinar si el NF $\kappa$ B se activa en respuesta a la PRL-16K.
2. Analizar si la vía JAK/STAT-5 se activa en respuesta a PRL y media el efecto inhibitorio de la PRL sobre la producción de NO.
3. Analizar si las citocinas proinflamatorias regulan la expresión del mRNA del receptor de PRL.

### **Parte 2. En condrocitos aislados de cartílago articular:**

1. Determinar la presencia y secreción de proteasas capaces de procesar a la PRL hacia PRL-16K.
2. Caracterizar dichas proteasas de PRL en función de:
  - la especie (rata y humano)
  - bloqueo de su acción con inhibidores específicos de diversos grupos de proteasas
3. Determinar si la PRL-16K resultante del procesamiento por condrocitos es antiangiogénica.
4. Analizar la proteólisis de PRL por MMPs puras.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Prolactinas y citocinas**

Se utilizaron preparaciones estándar de prolactinas obtenidas tanto de adenohipófisis de rata como de humano (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, NIH). La PRL-16K de rata se generó en el laboratorio mediante el procedimiento previamente descrito de proteólisis, reducción y carbamidometilación (Clapp et al., 1988). La PRL-16K humana recombinante generada en células de insecto fue donada por la Dra. Sue-Hwa Lin (MD Anderson Medical Center, Houston, Texas, EUA). Las citocinas IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

### **5.2 Anticuerpos**

Para la detección de prolactina se utilizaron antisueros dirigidos contra PRL humana y PRL de rata generados en el laboratorio y previamente caracterizados (Dueñas et al., 2004), y el anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo carboxilo-terminal de la PRL humana (INN-368, donado por el Dr. Peter Berger, Academia de Ciencias de Austria, Innsbruck, Austria). Para la detección de NF $\kappa$ B y sus proteínas inhibidoras, se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-p65, anti-I $\kappa$ B $\alpha$  y anti-I $\kappa$ B $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Para la detección de STAT-5 se utilizó el anticuerpo policlonal anti-STAT-5 donado por la Dra. Li-Yuan Yu-Lee (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA) y para la detección de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (anti-PY), donado por el Dr. Carlos Rosales (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). El cDNA de IRF-1 fue donado por la Dra. Yu-Lee.

### **5.3 Fibroblastos**

Los fibroblastos se aislaron de pulmones de fetos de ratas de 19-20 días de gestación, de acuerdo al método previamente descrito por Caniggia et al., (1991).

Brevemente, los pulmones se extraen, se maceran y se lavan en solución de Hank's (Gibco, BRL). El tejido se incuba en presencia de 0.05% de tripsina (Gibco, BRL) y 0.4 mg/ml de DNAsa (Sigma) durante 20 min a 37°C. Posteriormente se realiza una segunda incubación en presencia de 1% de colagenasa tipo I (Sigma) y 0.2 mg/ml de DNAsa. Las células obtenidas se siembran durante 45 min a 1 hr y después se elimina el resto de las células no adheridas. Las células se lavan con solución de Hank's y se incuban en medio F12K suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, BRL) y antibióticos (1000 unidades/ml de penicilina y 1000 µg/ml de estreptomycin) a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire, hasta que alcanzan la confluencia (3 ó 4 días).

#### **5.4 Condrocitos**

El cartílago se obtuvo de la superficie de los placas tibiales y de los cóndilos femorales de ratas Wistar machos de 120-150 g. Se utilizan 10 ratas Wistar de las que se obtienen idealmente 8 X 10<sup>6</sup> condrocitos. El tejido se corta en pequeños fragmentos y se digiere con tripsina al 0.025% durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente se centrifuga 10 min a 1200 rpm y el pellet se incuba con colagenasa tipo-2 al 0.02% en agitación a 37° C durante 2 hrs. Los agregados celulares residuales se extraen por sedimentación, las células se filtran a través de una malla de nylon con poros de 80 µm de diámetro, se centrifugan 10 minutos a 1200 rpm y el paquete celular se lava con medio DMEM suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, BRL). Se centrifugan 10 min a 1200 rpm y el pellet celular se congela o se resuspende en DMEM con SFB al 5% y gentamicina (0.1 mg/ml) y se cultiva a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub> para la obtención del medio condicionado.

#### **5.5 Homogeneizados y medios condicionados de condrocitos**

Después del aislamiento, los condrocitos se homogeneizan resuspendiéndolos con una micropipeta en amortiguador de lisis (50 mM NaCl, 150 mM Tris, 0.1% SDS, 1% Igepal, 1µg/ml aprotinina y 100 µg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo), se dejan incubando 15 minutos en hielo para que se complete la lisis y después se



centrifugan a 10,000 X g y los sobrenadantes se congelan a -70°C. Para la obtención de medios condicionados, los condrocitos ( $2 \times 10^6$ ) se siembran en placas de cultivo de 35 mm durante 24 hrs en medio con 5% de SFB, después se colectan los medios y se centrifugan a 1,200 X g durante 5 minutos para descartar los sedimentos celulares y los sobrenadantes se concentran 5 veces (Centricon 3: Amicon Millipore, Billerica, Massachusetts) y se congelan a -70°C.

### **5.6 Determinación de nitratos y nitritos mediante la reacción de Griess**

Después de los tratamientos correspondientes, se obtienen alícuotas de 100 µl de los medios de cultivo de las células para medir los productos estables de la oxidación del NO, nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ). Para esto, las muestras son inicialmente incubadas con la enzima reductasa de nitrato proveniente de *E.coli* (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) con el propósito de convertir a nitrito todo el nitrato presente en las muestras. Posteriormente, se evalúa la presencia neta de nitrito mediante el reactivo de Griess (Gutiérrez et al., 1995) y se cuantifica la densidad óptica de la reacción en un espectrofotómetro. Se utilizó como patrón una solución de nitrato de sodio diluido en el mismo medio en que fueron cultivadas las células.

### **5.7 Aislamiento de RNA, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

El RNA total de las células se extrajo usando el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi 1987). El RNA total (5µg) fue retrotranscrito utilizando la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega, Madison, Wisconsin) y oligo dT (16) (New England Biolabs). Después de la retrotranscripción se realiza la PCR de acuerdo a las condiciones descritas previamente por Corbacho et al. (2000 y 2003). La amplificación de iNOS se hace utilizando los siguientes iniciadores: sentido 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3' y el antisentido 5'-CTCCTGCCCACTGAG TT-3'. Para el receptor de prolactina, se utilizaron los iniciadores: sentido 5'-ATCCTGGGCAGATGGAGGAC-3' y antisentido 5'-

ATCCACACGGT<sup>T</sup>TGTGT CCTTC-3'. Como controles internos se amplificaron los mensajeros de la proteína ribosomal L19 (RPL-19) y de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), con los siguientes iniciadores: para RPL19, sentido 5'-CGAAATCGCCAATGCCAACTC-3' y antisentido 5'-TGCTCCATGAGAATCCGC TTG-3', para la G6PDH, sentido 5'-GACCTGCAGAGCTCCAATCAAC-3' y antisentido 5'-CACGACCCTCAGTAC CAAAGGG-3'. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: para iNOS, 2.5' a 94°C, 37 ciclos de 30'' a 94°C, 45'' a 60°C y 45'' a 72°C, y al final de los ciclos, 7' a 72°C. Para el receptor de PRL, 2.5' a 94°C, 40 ciclos de 30'' a 94°C, 45'' a 56°C y 45'' a 72°C, y al final de los ciclos, 7' a 72°C. Tanto para RPL-19 como para G6PDH, 2.5' a 94°C, 21 ciclos de 30'' a 94°C, 45'' a 58°C y 45'' a 72°C, y al final de los ciclos, 7' a 72°C. Para el PCR en tiempo real se utilizaron también RPL19 y G6PDH como controles internos, se usó 1 µl de la reacción de transcripción inversa (cDNA) y 7.5 µl del reactivo quantitec SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany), con una concentración de 400 nM de los iniciadores sentido y antisentido en un volumen final de reacción de 15 µl. La detección y el análisis de datos se hizo utilizando un equipo LightCycler de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

## 5.8 Northern blot

Para detectar la expresión del RNA mensajero de IRF-1, 10 µg del RNA extraído de los fibroblastos fue desnaturalizado y procesado en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes con formaldehído al 1%. Para el Northern blot se utilizó un fragmento específico de 1.5 kb de cDNA para IRF-1 de rata, marcado con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). La membrana se lavó e hibridó con el cDNA para la proteína <sup>32</sup>P-RPL-19, como un control de que se ha cargado la misma cantidad de RNA para cada condición (protocolo de Northern blot según Current Protocols in Molecular Biology).

### **5.9 Actividad de la(s) proteasa(s) que genera a la PRL-16K en condrocitos**

La actividad enzimática capaz de procesar a la PRL hacia PRL-16K se analizó de acuerdo al siguiente método. Se utilizaron distintas concentraciones de homogeneizados (0.25, 0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$ ) y se incubaron en amortiguador de incubación (Tris 50 mM, NaCl 150 mM y  $\text{CaCl}_2$  10mM) a distintos pHs, en presencia de 200 ng de prolactina humana o de rata en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Las incubaciones se realizaron durante 24 hrs a 37°C en agitación. Para el caso de los medios condicionados, se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  de medios y se incubaron en amortiguador Tris a pH 7 en las mismas condiciones descritas arriba. La actividad enzimática se caracterizó mediante el uso de distintos inhibidores: (a) de MMPs: EDTA (5mM) y 1, 10-fenantrolina (10 mM); (b) de proteasas de serina: PMSF (1mM) y aprotinina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); (c) de proteasas de aspártico (como catepsina D): pepstatina A (1.4  $\mu\text{M}$ ); (d) de proteasas de cisteína: E64 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los productos del corte de la PRL se analizaron mediante Western blots en condiciones reductoras.

### **5.10 Actividad enzimática de las metaloproteinasas**

La actividad enzimática de las diferentes MMPs se evaluó incubando 200 ng de PRL humana, en amortiguador Tris pH 7, en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y diferentes concentraciones de MMPs. Las incubaciones se realizaron a 37°C en agitación durante 24 hrs. Los productos de la proteólisis se analizaron mediante Western blots en condiciones reductoras.

### **5.11 Western blot**

Los productos de la proteólisis de la PRL se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se utilizaron los 20  $\mu\text{l}$  de la reacción de corte (conteniendo 200 ng de PRL) y se mezclaron con 8  $\mu\text{l}$  de amortiguador de laemli 2X. Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con 5% de leche descremada (BioRad)

durante 2 hrs, y se incubaron con los anticuerpos policlonales anti PRL humana o anti PRL de rata a una dilución de 1:2000, o con el anticuerpo monoclonal INN-368 a una dilución 1:500, toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS tween al 0.5% y se incubaron durante 1 hr. con los anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch labs, Inc.) anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa a una dilución 1:15,000 o anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:5,000 o con el anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:5,000. Las membranas se lavaron 3 veces. Los anticuerpos acoplados a peroxidasa, se revelaron mediante el uso un estuche comercial de quimioluminiscencia (Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology, Rochford Illinois) y el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina se reveló mediante el uso de un estuche comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

### **5.12 Secuenciación de los fragmentos de PRL obtenidos mediante la proteólisis con extractos de condrocitos**

Las secuenciaciones amino-terminales fueron realizadas mediante la degradación de Edman automatizada en colaboración con el Dr. Manuel Aguilar de la Unidad de Bioquímica Analítica del Instituto de Neurobiología-UNAM. Brevemente, se incubaron 10 µg de PRL con 5 µg de condrocitos o con 10 µl de medio condicionado en un volumen final de 40 µl con amortiguador de incubación a pH 7. De manera similar, se obtuvieron las secuencias de los fragmentos de PRL generados mediante la incubación con las MMPs purificadas. Se incubaron 10 µg de PRL humana con 50 ng de MMP-1, 1.5 µg de MMP-2, 100 ng de MMP-3, 30 ng de MMP-8, 1.5 µg de MMP-9 o 50 ng de MMP-13. Los fragmentos derivados de la proteólisis de la PRL se procesaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (se corrieron de 2 a 10 µg de PRL por carril). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF y se tiñeron con una solución de azul de coomassie R-250 al 0.05% en metanol al 50% durante 15 minutos y desteñidas en una solución de metanol al 50% durante 5-10 minutos. Las bandas de prolactina cortada (25kDa) o las bandas de 16kDa se cortaron, se eluyeron y se analizaron directamente en el

equipo Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems; Foster City, CA), evaluando de 4-6 ciclos de secuenciación (4-6 ciclos).

### **5.13 Proliferación de células endoteliales**

Células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) fueron sembradas a una densidad de 5,000 por pozo en cajas de cultivo de 96 pozos (Costar). La PRL-16K producto del procesamiento de PRL por condrocitos o la PRL sin procesar se adicionó a las células endoteliales a una concentración de 100 nM (cuantificada a través de someter a SDS-PAGE a las proteínas, teñirlas con azul de coomassie y analizadas mediante densitometría), en presencia o ausencia de bFGF (5 ng/ml). Al cabo de 48 hrs de incubación los cultivos se trataron con un pulso con 500,000 cpm de timidina tritiada (0.6  $\mu$ Ci, actividad específica 20.1 Ci/mmol) (Sigma) y se incubaron durante 14 hrs, al término de las cuales, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 5% (w/v) a 4°C durante 20 minutos. El precipitado resultante se lavó dos veces con 5% TCA y se solubilizó con 250  $\mu$ l de NaOH 0.25M a 50°C. La radioactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones beta.

### **5.14 Vías de señalización**

#### **5.14.1 Fosforilación de STAT-5**

La activación de STAT-5 se evaluó en fibroblastos tratados o no con PRL (10 nM) y/o la mezcla de citocinas proinflamatorias (Cyt) IL1- $\beta$  (2.5 ng/ml = 150 pM), TNF- $\alpha$  (12.5ng/ml = 700 pM) e IFN- $\gamma$  (50 ng/ml = 3 nM ) o con PRL y Cyt. Las células fueron pretratadas durante 6 horas con Cyt y después con PRL durante 30 minutos, al término de la incubación las células fueron homogeneizadas en amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% NP-40 (Igepal), 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato de sodio y 1 mM NaF). Para la inmunoprecipitación, los lisados se centrifugaron y los sobrenadantes se prelimpiaron con proteína-A sefarosa (50  $\mu$ l de una preparación 1 mg/ml en 450

ml de amortiguador) durante 1 hr en agitación a 4°C, después incubaron con el anticuerpo anti STAT-5 (2 µg/ml) toda la noche en agitación a 4°C, se procesaron por SDS-PAGE 7.5% y Western blot y se revelaron con anticuerpos monoclonales anti-tirosinas fosforiladas (5 µg/ml), se lavaron y se volvieron a revelar con el anticuerpo anti STAT-5 (1:1000) de acuerdo al método descrito (Wang y Yu-Lee 1996).

#### **5.14.2 Activación de NFκB**

La activación de NFκB se analizó a través de determinar su translocación al núcleo mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-p65 (subunidad de NFκB). Las células fueron sembradas a baja densidad (50,000 células en placas de 21 mm), tratadas con o sin PRL 16K (160 ng/ml = 10 nM) o TNF-α (50ng/ml = 3 nM) durante 2 hrs o 20 minutos, respectivamente. Al término de la incubación, las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se bloquearon con suero normal de cabra al 10%, y se incubaron con el anticuerpo anti-p65 durante toda la noche a 4°C, y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína diluido 1:100.

Para los ensayos de retardo en gel, las células se trataron con PRL-16K (160 ng/ml) o TNF-α (50ng/ml) durante distintos tiempos. En dichos ensayos, los extractos nucleares se incubaron con una secuencia de DNA (Macotela et al., 2002) que reconoce específicamente a NFκB y que está marcada radioactivamente. La presencia de NFκB en los extractos nucleares se detectó en función de la migración diferencial del complejo DNA-NFκB (que es más lenta cuando hay unión de NFκB/DNA) en geles de poliacrilamida. La especificidad de la unión se evaluó en presencia de un exceso de DNA no marcado usando la misma secuencia o con la secuencia mutada. Estos ensayos de retardo se hicieron en colaboración con Criselda Mendoza del laboratorio del Dr. Alejandro Zentella, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de acuerdo al método descrito (Reyes-Reyes et al., 2001).

### 5.14.3 Degradación de las proteínas IκB

La degradación de las proteínas inhibidoras de NFκB se analizó en los homogeneizados celulares (25 μg/carril) después del tratamiento con o sin PRL-16K o TNF-α mediante SDS-PAGE al 12% y Western blots, con anticuerpos anti IκB-α y anti IκB-β (1 μg/ml), así como también en presencia de Bay 117085, inhibidor específico de la degradación de las proteínas IκB (Pierce et al., 1997). Para validar que se cargara la misma cantidad de proteína por carril, se lavaron las membranas y se detectó a la proteína beta-actina con un anticuerpo monoclonal (Sigma) a una dilución de 1:500. Los valores de densidad óptica se determinaron utilizando el programa de análisis de imágenes “1D” versión 3.5 de Kodak (Eastman Kodak company, Rochester NY). La normalización se hizo tomando uno de los valores de actina como 100% y a partir de ese valor calculando el porcentaje de las demás bandas de actina (ej. 90%, 110%). El porcentaje excedente o faltante de 100 que tuviera cada banda de actina era lo que se sumaba o restaba a la respectiva banda de IκB (ej. +10% ó -10%). Una vez normalizados, los valores se graficaron como el porcentaje respecto al valor al tiempo cero que se tomó como el 100%.

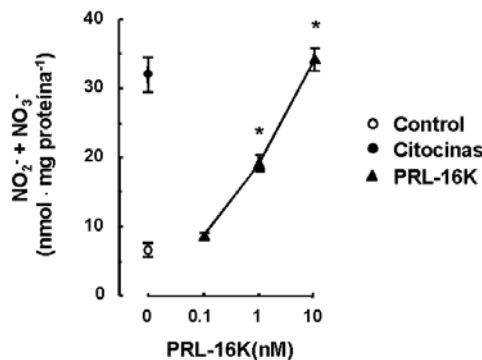
### 5.15 Análisis estadístico

Todos los experimentos se replicaron al menos en tres ocasiones independientes. Los valores de la degradación de las proteínas IκB se compararon mediante el análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de rangos Duncan. El resto de los resultados se analizaron mediante la prueba T de Student no apareada en donde un valor de  $P \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 La PRL-16K estimula la expresión de NFκB en fibroblastos de pulmón

En primer lugar corroboramos que la PRL-16K estimula la producción de NO y que lo hace con una potencia comparable a la ejercida por la combinación de citocinas proinflamatorias IL1-β, TNF-α e IFN-γ (Fig.2).



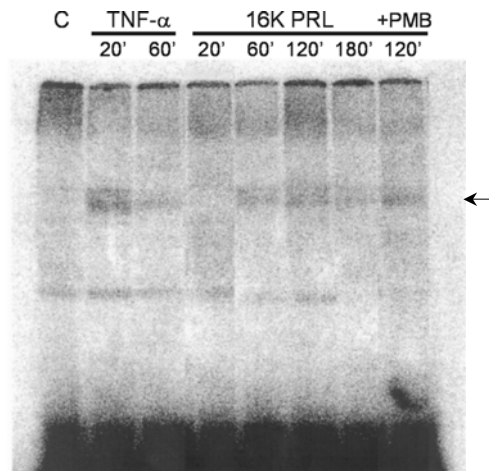
**Fig.2 La PRL-16K estimula la producción de NO en fibroblastos de pulmón.** Las células fueron tratadas con o sin PRL-16K o citocinas proinflamatorias (IL1-β 1nM, TNF-α 1.4 nM e IFN-γ 6 nM) durante 72 hrs. La producción de NO se midió como la acumulación de nitratos y nitritos en el medio de cultivo.

Observamos que como habíamos reportado previamente (Corbacho et al., 2000a), la PRL-16K de rata en dosis de 1 y 10 nM, estimula la producción de NO por fibroblastos de pulmón, y que dicha estimulación es comparable en potencia y magnitud con el efecto ya conocido y bien caracterizado de la mezcla de citocinas proinflamatorias: IL1-β, TNF-α e IFN-γ, en dosis de 1 nM, 1.4 nM y 6 nM respectivamente (Asano et al., 1994, Robbins et al., 1994, Lavnikova et al., 1995).

Con el fin de determinar cual es la vía de señalización utilizada por la PRL 16K para estimular la producción de NO, se analizó en los fibroblastos de pulmón, el efecto de la PRL-16K sobre la activación del factor NFκB, por ser un factor de transcripción muy importante para estimular la expresión de iNOS. En primer lugar se evaluó la unión de NFκB al DNA en respuesta a PRL-16K y se comparó con la respuesta obtenida mediante el tratamiento con TNF-α, un conocido estimulador de la actividad de NFκB (Baud y Karin 2001). Se prepararon extractos nucleares de

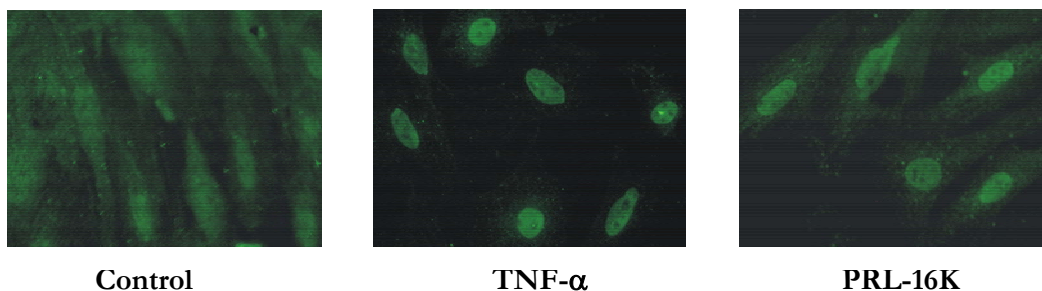


fibroblastos tratados con PRL-16K o TNF- $\alpha$  a diferentes tiempos y mediante ensayos de retardo en gel, se analizó la unión del NF $\kappa$ B presente en los núcleos celulares a una secuencia de DNA consenso para el sitio de unión  $\kappa$ B, marcada radioactivamente. Tanto el TNF- $\alpha$  como la PRL-16K estimularon la formación de un complejo similar aunque con una cinética distinta. El tratamiento con TNF- $\alpha$  indujo la formación del complejo a los 20 min y la señal declinó a los 60 min (Fig.3), mientras que el tratamiento con PRL-16K indujo la formación del complejo con una latencia mayor (60 minutos), que fue máxima a los 120 min y declinó a los 180 minutos (Fig.3). Ya que LPS de las membranas bacterianas son conocidos inductores del NF $\kappa$ B (Xie et al., 1994), se analizó el efecto de la PRL-16K en presencia de polimixina-B (PMB), un inhibidor de LPS. Se observó que la PMB no interfiere con la formación del complejo NF $\kappa$ B/DNA inducido por la PRL-16K (Fig.3), indicando que en el efecto no intervienen contaminantes de origen bacteriano y por lo tanto que la PRL-16K *per se* estimula la activación del NF $\kappa$ B.



**Fig.3 La PRL 16K estimula la translocación al núcleo de NF $\kappa$ B.** Los fibroblastos fueron incubados en ausencia (C) o presencia de TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) o PRL-16K (160 ng/ml) con o sin polimixina-B (PMB 10 $\mu$ g/ml), durante los tiempos indicados, al término de los cuales se prepararon extractos nucleares que fueron incubados con una secuencia de DNA consenso marcada con  $^{32}$ P conteniendo el sitio NF $\kappa$ B, y después fueron analizados mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). La especificidad de la reacción fue comprobada usando 100 veces mas de la secuencia no marcada como competidor (no se muestra). La flecha señala los complejos específicos.

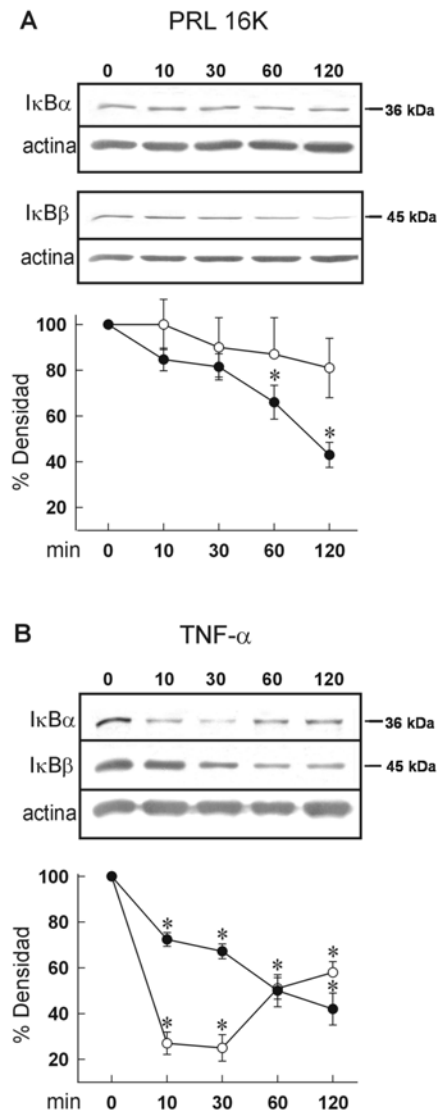
Para corroborar la activación de NFκB inducida por PRL-16K en los fibroblastos, se analizó la localización subcelular de este factor transcripcional mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos dirigidos contra la subunidad p65 del NFκB. En ausencia de tratamiento, NFκB (p65) se distribuyó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. Mientras que bajo el tratamiento con PRL-16K, al igual que con el tratamiento con TNF-α la localización de (NFκB) p65 fue fundamentalmente nuclear (Fig.4). Por lo tanto, nuestros hallazgos muestran que la PRL-16K activa al NFκB bajo dos diferentes criterios, la estimulación de la translocación del NFκB al núcleo y la estimulación de su unión a secuencias nucleares específicas. La cinética de activación de NFκB inducida por PRL-16K, es semejante a la observada con factores de crecimiento como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), que induce la translocación al núcleo de NFκB a los 60 min y alcanza un máximo a los 180 min (Romanshkova & Madarov 1999). El TNF-α, en cambio, induce una translocación rápida, que es máxima a los 20 min, y es consistente con lo reportado previamente para otros tipos celulares (Ozes et al., 1999).



**Fig.4 La PRL-16K induce la translocación nuclear del NFκB.** Detección de NFκB (p65) mediante inmunofluorescencia en fibroblastos cultivados en ausencia (control) o presencia de TNF-α (50 ng/ml) durante 20 min ó de PRL- 16K (160ng/ml) durante 2 hrs.

La activación de NFκB depende de la degradación de las proteínas inhibitoras IκBs. En los fibroblastos de pulmón se analizó la cinética de degradación de las proteínas IκBα e IκBβ en respuesta al tratamiento con PRL-16K y TNF-α

durante diferentes tiempos (Fig.5). El análisis de la degradación de las IκBs se hizo en homogeneizados de fibroblastos mediante Western blots con anticuerpos específicos para cada isoforma. El tratamiento con la PRL-16K no alteró los niveles de IκBα en los tiempos analizados. Sin embargo, indujo una degradación gradual de IκBβ, con un efecto máximo a los 120 min de tratamiento (Fig.5A). Esta cinética de degradación de IκBβ fue similar a la observada en respuesta a TNF-α. En contraste con la PRL-16K, el TNF-α indujo una degradación rápida y transitoria de la proteína IκBα, observándose una recuperación de los niveles basales a partir de los 60 minutos (Fig.5B).



**Fig.5 La PRL-16K induce la degradación de IκB-β en fibroblastos.**

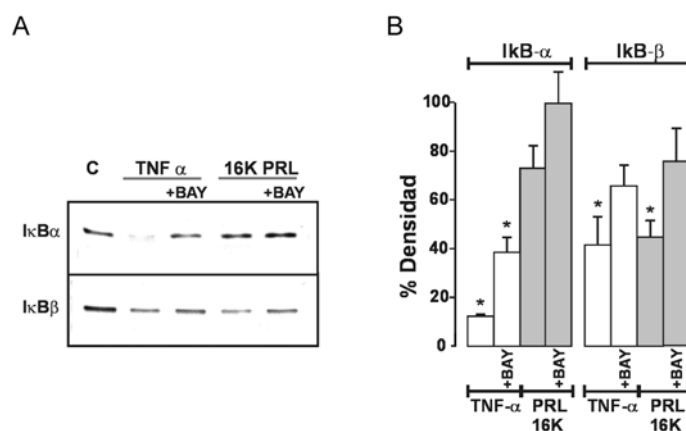
Los homogenados celulares se analizaron mediante Western blots después de tratar a las células con o sin PRL-16K (160ng/ml) (A) ó TNFα (50 ng/ml) (B) durante los tiempos indicados. La degradación de las isoformas de IκB se analizó con anticuerpos anti-IκBα (○) o anti-IκBβ (●). Las mismas membranas se lavaron y se revelaron con el anticuerpo anti actina como control. Las bandas de IκB se cuantificaron por densitometría, se normalizaron con respecto al valor de actina y se graficaron como porcentaje del valor al tiempo cero. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes ± SEM. \* p< 0.05 con respecto al valor del tiempo cero.

Así el TNF- $\alpha$  indujo la degradación de ambas proteínas I $\kappa$ B (alpha y beta), mientras que la activación de NF $\kappa$ B por PRL-16K se asoció con la degradación de I $\kappa$ B $\beta$  pero no de I $\kappa$ B $\alpha$ . La degradación de I $\kappa$ B $\beta$  por PRL-16K es consistente con su capacidad de estimular NF $\kappa$ B, si bien las implicaciones funcionales de las diferencias en degradación de las diferentes proteínas I $\kappa$ B se desconocen hasta el momento. Al respecto, se han mostrado variaciones en la cinética de activación de NF $\kappa$ B y en la degradación de las I $\kappa$ B entre las diferentes citocinas (TNF  $\alpha$ , IL1- $\beta$ , PDGF) y entre los tipos celulares (células endoteliales, células del sistema inmune, fibroblastos, etc) y se ha propuesto que estas diferencias podrían tener un impacto en el tipo de genes activados por NF $\kappa$ B (por ejemplo, genes de respuesta a estrés) (Johnson et al., 1996).

La degradación de las proteínas I $\kappa$ B depende de su fosforilación por el complejo de cinasas IKK. En los fibroblastos, se observó que un inhibidor específico del complejo IKK (BAY 117085) que inhibe la fosforilación de las I $\kappa$ Bs (Pierce et al., 1997), inhibió la degradación de I $\kappa$ B $\beta$  inducida por PRL-16K (Fig.6). Asimismo, el BAY 117085 interfirió con la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  inducida por TNF- $\alpha$  (Fig.6).

En conclusión, estos resultados muestran por primera vez que la PRL-16K es capaz de activar al factor de transcripción NF $\kappa$ B y que por lo tanto la activación de NF $\kappa$ B podría ser parte importante del mecanismo de señalización por el cual la PRL-16K estimula la expresión de iNOS y la producción de NO en los fibroblastos. Esta posibilidad debe ser corroborada mediante experimentos en los que se bloquee la expresión de iNOS y la producción de NO inducidos por PRL-16K mediante el uso de inhibidores de la vía NF $\kappa$ B, como podría ser el ácido acetilsalicílico (Yin et al., 1998, Frantz y O'Neill 1994). En apoyo a nuestros resultados, recientemente se demostró que el mecanismo mediante el cual la PRL-16K inhibe la apoptosis del endotelio, involucra la activación del NF $\kappa$ B (Tabruyn et al., 2003). Lo que sugiere

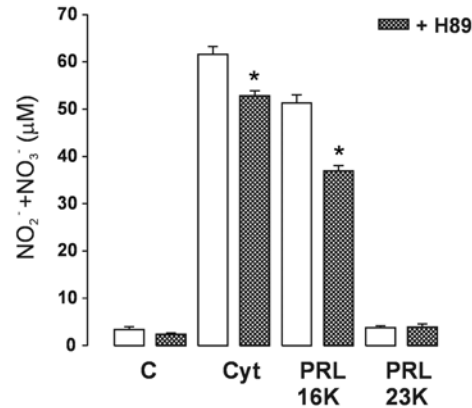
que la activación de este factor de transcripción, podría ser un mecanismo de señalización de la PRL-16K general a todas sus células blanco.



**Fig.6 Bloqueo de la degradación de IκBβ inducida por PRL-16K mediante el uso de un inhibidor de las cinasas de IκB.** (A) Análisis por Western blots de fibroblastos control (C) o tratados con TNFα (50 ng/ml) durante 20 min o con PRL-16K (160 ng/ml) durante 2 hrs en ausencia o presencia del pretratamiento con BAY 117085 (1 mM) por 30 min. La degradación de las proteínas IκB se analizó mediante el uso de anticuerpos específicos para cada isoforma. (B) La densidad óptica de las bandas se graficó como el porcentaje del control sin tratamiento. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  con respecto al valor del tiempo cero.

La activación de la expresión de iNOS requiere de la acción de varios factores de transcripción. El hecho de que la PRL-16K (1-10 nM) por si sola estimula la producción de NO con una potencia comparable a la de la combinación de tres citocinas proinflamatorias (IL1-β: 1 nM, TNF-α: 1.4 nM e IFN-γ: 6 nM), sugiere que, además del NFκB, induce la activación de otros factores de transcripción. A este respecto, se ha reportado que en el endotelio la PRL-16K induce un incremento en la actividad de la PKA (proteína cinasa A), y de los niveles de AMP cíclico (cAMP) (D'Angelo et al., 1999). El cAMP estimula la activación del factor de transcripción CREB (cAMP response element binding protein) (importante para la expresión de iNOS) (Kinugawa et al., 1997, Mayr y Montminy 2001), a través de activar a la PKA. En los fibroblastos de pulmón el tratamiento con H89, un inhibidor de la PKA (Won

et al., 2001), disminuyó el efecto estimulador de la PRL-16K sobre la producción de NO (Fig7). Si bien es necesario caracterizar este efecto, analizando la producción de cAMP y la activación de CREB en respuesta a PRL-16K, este resultado sugiere la participación de dicho factor de transcripción en el mecanismo de señalización de la PRL-16K para inducir la expresión de iNOS.

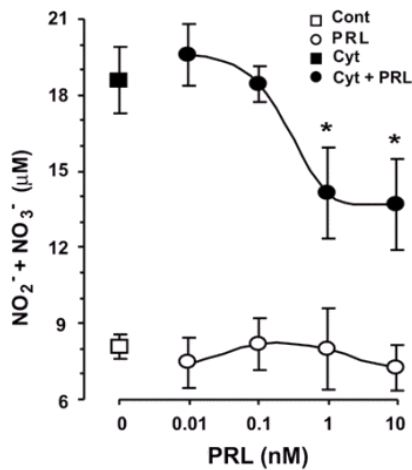


**Fig.7 H89 el inhibidor de la PKA disminuye el efecto estimulador de la PRL-16K sobre la producción de NO.** Los fibroblastos fueron preincubados durante 90 min en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras oscuras) de H89 y posteriormente fueron incubados sin (C) o con la mezcla de citocinas proinflamatorias (Cyt: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), PRL-16K (10 nM) o PRL 23K (10 nM) durante 12 hrs. La producción de NO fue medida como la acumulación de nitratos y nitritos en el medio de cultivo.

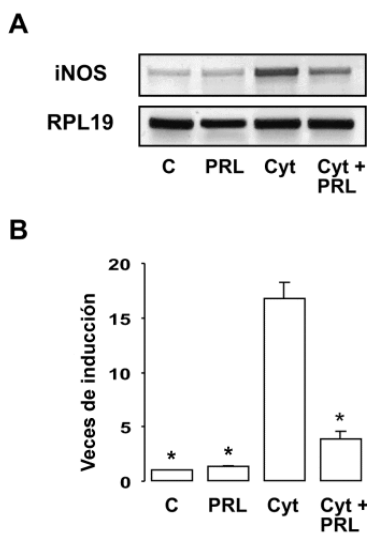
## 6.2 La PRL inhibe la expresión de iNOS estimulada por citocinas

A diferencia de la PRL-16K, la PRL no mostró ningún efecto sobre la producción basal de NO en los fibroblastos. Ya que el NO actúa como un importante mediador inflamatorio, pensamos que en un ambiente inflamatorio se podría favorecer una posible acción inhibitoria de la PRL sobre la producción de NO. Para analizar esta posibilidad, se determinó el efecto de la PRL sobre la producción de NO tanto basal como estimulada por la combinación de citocinas proinflamatorias. De acuerdo a lo esperado se observó que la PRL no tuvo efecto sobre la producción basal de NO, sin embargo en células tratadas con las citocinas, la

PRL inhibió la producción de NO de forma dependiente de la dosis (Fig.8). Es bien conocido que las citocinas proinflamatorias ejercen su efecto sobre la producción de NO a través de estimular la expresión de iNOS (Geller y Billiar 1998). En concordancia con estos hallazgos, mediante RT-PCR convencional y tiempo real se observó que la PRL inhibió la expresión de iNOS inducida por la mezcla de citocinas proinflamatorias, pero no inhibió la expresión basal de esta enzima (Fig.9).



**Fig.8 La PRL inhibe la producción de NO estimulada por las citocinas proinflamatorias en los fibroblastos.** Las células fueron pre-tratadas sin (Cont) o con citocinas proinflamatorias (Cyt) (IL-1β, 2.5 ng/ml; IFNγ, 50 U/ml; y TNFα, 12.5 ng/ml) e incubadas posteriormente con PRL (10 nM). La producción de NO fue medida como la acumulación de nitratos y nitritos en el medio de cultivo. Los valores representan la media ± SEM. \*P ≤ 0.05 con respecto al valor en respuesta a las citocinas solas.



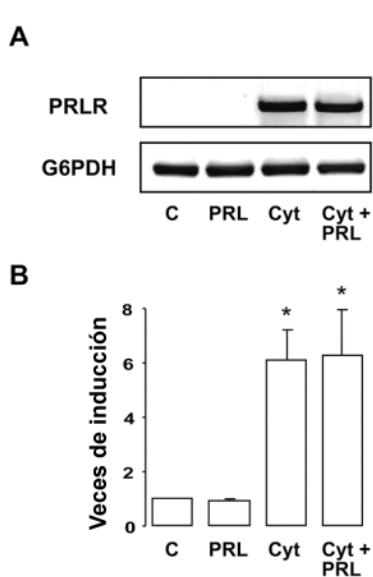
**Fig.9 La PRL inhibe la expresión de iNOS inducida por las citocinas proinflamatorias en los fibroblastos.** A: El RNAm de iNOS se analizó por RT-PCR. Como control de concentración de RNA se amplificó RPL19. B: Cuantificación de la expresión del RNAm de iNOS por medio de PCR en tiempo real. Las células fueron pre-tratadas sin o con citocinas (Cyt) (IL-1β, 2.5 ng/ml; IFNγ, 50 U/ml; y TNFα, 12.5 ng/ml) e incubadas posteriormente en ausencia o presencia de PRL (10 nM) durante 24 hrs. Células sin tratamiento (C), tratadas con citocinas (Cyt), tratadas con prolactina (PRL), tratadas con citocinas y prolactina (Cyt + PRL). \*P ≤ 0.05 con respecto al valor de las citocinas solas.

La ausencia de efecto de la PRL sobre la producción de NO era esperada ya que por estudios de RT-PCR no detectamos la expresión del receptor de PRL en los fibroblastos (Corbacho et al., 2000b). Sin embargo, el efecto inhibitorio de la prolactina sobre la expresión y la producción de NO estimulada por las citocinas proinflamatorias planteó como una posibilidad que dichas citocinas proinflamatorias pudieran estimular la expresión del receptor de PRL y con ello permitir el efecto inhibitorio de la hormona. Mediante RT-PCR, se confirmó que en los fibroblastos en condiciones basales y tratados con PRL no se detecta la expresión del receptor de PRL, sin embargo el tratamiento con citocinas proinflamatorias resulta en una marcada inducción de dicho receptor (Fig.10A). El análisis por RT-PCR en tiempo real mostró que la inducción del receptor de PRL fue de 6 veces el nivel basal (Fig.10B). La combinación de PRL y citocinas no modificó la expresión del receptor de PRL observada solo con el tratamiento de citocinas, lo que sugiere que la PRL no afecta la expresión de su propio receptor en este tipo celular. Este análisis era importante, ya que en una línea celular de linfocitos T la PRL por sí misma es capaz de estimular la expresión de su receptor (Di Carlo et al., 1995). Además de la PRL, se ha mostrado que los estrógenos pueden estimular la expresión del receptor de PRL en particular en el epitelio mamario normal y tumoral (Ormandy et al., 1997, Leondires et al., 2002) y en el hígado, el riñón (Sakaguchi et al., 1994) y en el cerebro de ratas hembras (Pi et al., 2003). A este respecto, los hallazgos de este trabajo resultan muy novedosos ya que proponen que la estimulación de la expresión de los receptores de PRL puede ser relevante en aquellas células que normalmente están desprovistas de ellos. Los tipos celulares aparentemente carentes del receptor de PRL son escasos (fibroblastos y células endoteliales), pues el receptor de PRL se expresa en prácticamente todos los tipos celulares y tejidos estudiados (Freemark et al., 1997, Tzeng y Linzer 1997, Bole-Feysot et al., 1998).

Dado que los fibroblastos y las células endoteliales son actores importantes en los procesos de angiogénesis e inflamación, la participación de la PRL en ambos procesos estaría determinada por el microambiente específico de dichos procesos capaz de influir sobre el nivel de expresión de su receptor y con ello sobre la



expresión de iNOS. Además, la probabilidad de que el receptor de PRL esté involucrado en la regulación del proceso inflamatorio, se apoya en diversas observaciones experimentales. Por ejemplo estudios de nuestro laboratorio muestran que la PRL estimula la adhesión de leucocitos al endotelio (Montes de Oca et al., enviado), proceso que se lleva a cabo durante la respuesta inflamatoria.

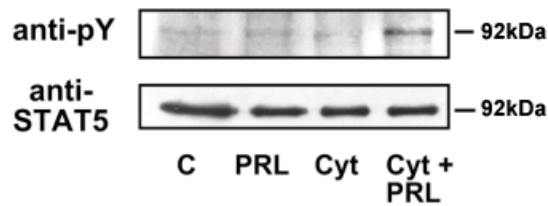


**Fig. 10 Las citocinas proinflamatorias inducen la expresión del receptor de PRL en fibroblastos.** A: Se analizó el RNAm para la forma larga del receptor de PRL por medio de RT-PCR a partir del RNA total. La amplificación de G6PDH se usó como control. B: Cuantificación de la expresión del RNAm de la forma larga del PRLR utilizando PCR en tiempo real. Las células fueron pre-tratadas sin o con citocinas (IL-1 $\beta$  2.5 ng/ml , IFN $\gamma$  50 U/ml y TNF $\alpha$  12.5 ng/ml) e incubadas posteriormente en ausencia o presencia de PRL (10 nM) durante 24 hrs. Células sin tratamiento (C), tratadas con citocinas (Cyt), tratadas con prolactina (PRL), tratadas con citocinas y prolactina (Cyt + PRL). \*P  $\leq$  0.05 con respecto al valor del control (C) y al valor de PRL.

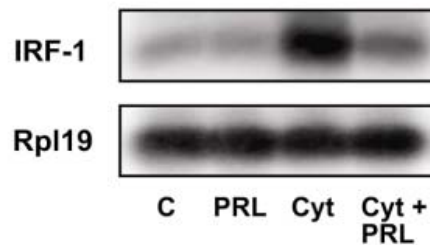
Para entender mejor la inhibición de iNOS en respuesta a PRL, nos interesó estudiar la vía de señalización que media este efecto en los fibroblastos. La vía JAK/STAT es el mecanismo de señalización clásico activado por prolactina; la interacción de la PRL con su receptor conlleva a la activación de JAK-2 y subsecuentemente a la fosforilación/activación de proteínas STAT, principalmente STAT-1 y STAT-5. Uno de los genes activados por STAT-1 en respuesta a PRL es IRF-1, un factor de transcripción importante para la expresión de iNOS (Kamijo et al., 1994, Martín et al., 1994). Sin embargo, mientras que STAT-1 activa la transcripción de IRF-1 en ciertos tipos celulares (Wang y Yu-Lee 1996, O'Neal et al., 1994), STAT-5 puede inhibirla (Luo et al., 1997, Yu-Lee et al., 1998, Luo et al., 2000). Por lo tanto, la activación de STAT-5 y la consecuente inhibición de IRF-1 pudieran

resultar en la menor expresión de iNOS en respuesta a PRL. Para analizar esta posibilidad, investigamos la fosforilación de la proteína STAT-5 y la expresión del RNA mensajero de IRF-1 en respuesta al tratamiento con PRL en ausencia y presencia de citocinas proinflamatorias. En condiciones basales, la PRL no modificó la fosforilación de STAT-5, sin embargo, en los fibroblastos tratados con las citocinas, la PRL estimuló la fosforilación en residuos de tirosina de STAT-5, en comparación con células sin ningún tratamiento o tratadas solo con Cyt (Fig.11). Este resultado apoya el efecto mostrado previamente de que las Cyt inducen la expresión de los receptores de PRL en los fibroblastos, de manera que una vez que los receptores se han expresado puede llevarse a cabo la activación de STAT-5 en respuesta a PRL. Más aún, encontramos que la PRL inhibe la expresión de IRF-1 inducida por las Cyt (Fig.12). En los fibroblastos sin tratamiento o tratados con PRL se observa un nivel basal similar de IRF-1, mientras que en las células tratadas con Cyt se incrementa su expresión. El efecto de las Cyt probablemente se debe a la acción del IFN $\gamma$  presente en la mezcla de ellas, ya que el IRF-1 es un gen de respuesta a IFN $\gamma$  (Kamijo et al., 1994). De manera que en presencia de las citocinas proinflamatorias la PRL activa a STAT-5, disminuyendo los niveles del RNA mensajero de IRF-1 (Fig.12).

Estudios previos utilizando células transfectadas con STAT-5 mostraron que STAT-5 inhibía la actividad de IRF-1 (Luo y Yu-Lee 1997), y en un reporte posterior del mismo grupo se mostró que STAT-5 también podía inhibir la unión de NF $\kappa$ B al DNA (Luo y Yu-Lee 2000). Para ambos efectos se propuso que el mecanismo involucrado era la unión e inactivación por STAT-5 del cofactor p300 que es necesario para que factores como STAT-1 y NF $\kappa$ B se unan al DNA y activen la transcripción (Luo y Yu-Lee 1997, Luo y Yu-Lee 2000). Nuestros hallazgos corroboran y validan este mecanismo en un cultivo primario de células que no ha sido modificado genéticamente y que son células que se sabe participan produciendo NO en reacciones inflamatorias de las vías respiratorias.



**Fig. 11 La PRL induce la fosforilación de STAT5 en los fibroblastos tratados con citocinas.** Las células fueron pre-tratadas sin o con la mezcla de citocinas durante 6 hrs y después incubados sin o con 10 nM de PRL durante 30 min. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti STAT5 y reveladas mediante Western blot con un anticuerpo anti fosfotirosina (anti-PY) y posteriormente la membrana fue lavada y re-teñida utilizando el anticuerpo anti STAT5.



**Fig. 12 La PRL inhibe la expresión de IRF-1 inducida por citocinas proinflamatorias en fibroblastos.** Análisis de Northern blot para IRF-1. Las células fueron pre-tratadas sin o con la mezcla de citocinas durante 6 hrs y después incubadas sin o con 10 nM de PRL durante 24 hrs.

Si bien puede ser aventurado, consideramos que es útil para la discusión especular sobre la posibilidad de que la regulación de la expresión del receptor de PRL y las acciones inhibitorias de esta hormona sobre la expresión de iNOS y la producción de NO podrían tener relevancia para el control del proceso inflamatorio. Bajo esta consideración, durante el proceso inflamatorio, las citocinas proinflamatorias inducirían la expresión del receptor de PRL permitiendo su acción antiinflamatoria como un mecanismo capaz de controlar la magnitud y duración del proceso inflamatorio.

Sin embargo, la regulación del receptor de PRL parece ser aún más compleja. Recientemente se mostró en un modelo *in vivo* de inflamación inducida por la inyección intraperitoneal de LPS, que el receptor de PRL se regula diferencialmente dependiendo del órgano analizado. En aquellos órganos relacionados con la respuesta inmune como son el timo y el bazo, el receptor de PRL se incrementa, mientras que en órganos como el pulmón, la próstata, el riñón y el corazón, la expresión del receptor disminuye (Corbacho et al., 2004). Si bien se trataba de un modelo crónico de inflamación y no se estudió la expresión del receptor específicamente en los fibroblastos pulmonares, es claro que la expresión del receptor de PRL está determinada por el tipo celular, y puede ser afectada tanto a la alza como a la baja por el proceso inflamatorio.

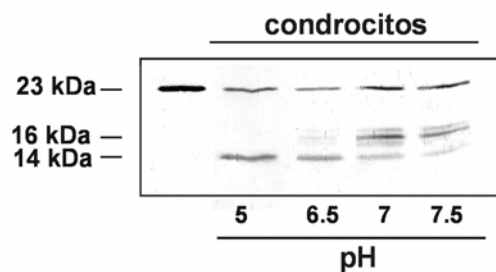
Por otra parte, el hecho de que la PRL y la PRL 16K ejerzan efectos opuestos sobre la expresión de iNOS y la producción de NO podría tener sentido si se consideran estas acciones separadas en el tiempo. Al respecto, una especulación posible sería el que al inicio de la inflamación, la PRL-16K podría participar en la estimulación de iNOS y NO y que eventualmente la acumulación de los receptores de PRL en respuesta a la acción de las citocinas proinflamatorias favorecería el efecto inhibitorio de la PRL sobre iNOS y NO, y con ello la atenuación del proceso inflamatorio.

En todo caso, es claro que la resultante final de las acciones de la PRL y la PRL 16K estará determinada en gran medida por la actividad proteolítica de la proteasa que genere a la PRL 16K a partir de PRL.

### **6.3 Presencia de proteasas neutras de PRL en condrocitos**

Con el fin de analizar la posible presencia de proteasas de PRL en un tejido avascular, investigamos si los condrocitos aislados del cartílago articular de la rata contienen proteasas neutras capaces de generar a la PRL-16K. Con tal propósito

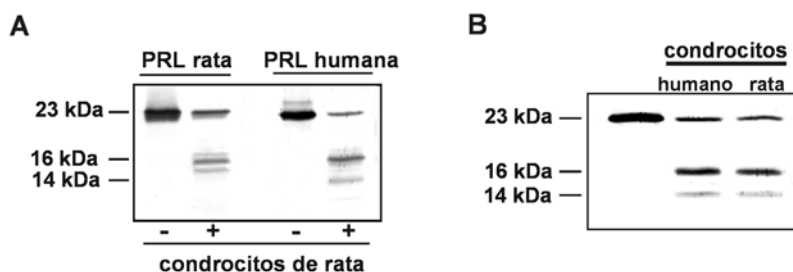
extractos de condrocitos se incubaron con una preparación pura de PRL humana bajo distintos pHs, y los fragmentos resultantes se analizaron por medio de Western blots. El análisis mostró la generación de diversos fragmentos con pesos moleculares aparentes de 14, 16 y 17 kDa. A un pH de 6.5, el fragmento mas abundante fue el de 14kDa, mientras que a pH 7 y 7.5 el fragmento predominante fue el de 16kDa (Fig.13). La generación de dichos fragmentos no dependió de la especie de prolactina utilizada como sustrato, ya que tanto la PRL humana como la PRL de rata fueron procesadas bajo condiciones neutras por los condrocitos de rata hacia un fragmento de 16kDa (Fig. 14), si bien el patrón fue ligeramente diferente. En contraste con el fragmento de 14kDa observado para la PRL humana (Fig. 14B), para la PRL de rata se observó un fragmento de 15 kDa (Fig. 14A). Más aún, las mismas enzimas que cortan a la PRL parecen estar presentes en ambas especies de condrocitos ya que las células humanas y las de rata, cortaron a la PRL humana con un mismo patrón (Fig. 14B).



**Fig.13 Los condrocitos cortan a la PRL humana bajo distintos pHs.**

Homogeneizados de condrocitos de rata (2 µg de proteína) fueron incubados a diferentes pHs durante 24 hrs con 200 ng de PRL humana. Los productos proteolíticos fueron evaluados mediante Western blot.

Estas observaciones son de interés puesto que si la PRL-16K posee relevancia funcional se esperaría que su generación fuera similar entre las especies y por lo tanto que involucrara mecanismos enzimáticos igualmente eficientes para la hormona de rata y la humana.

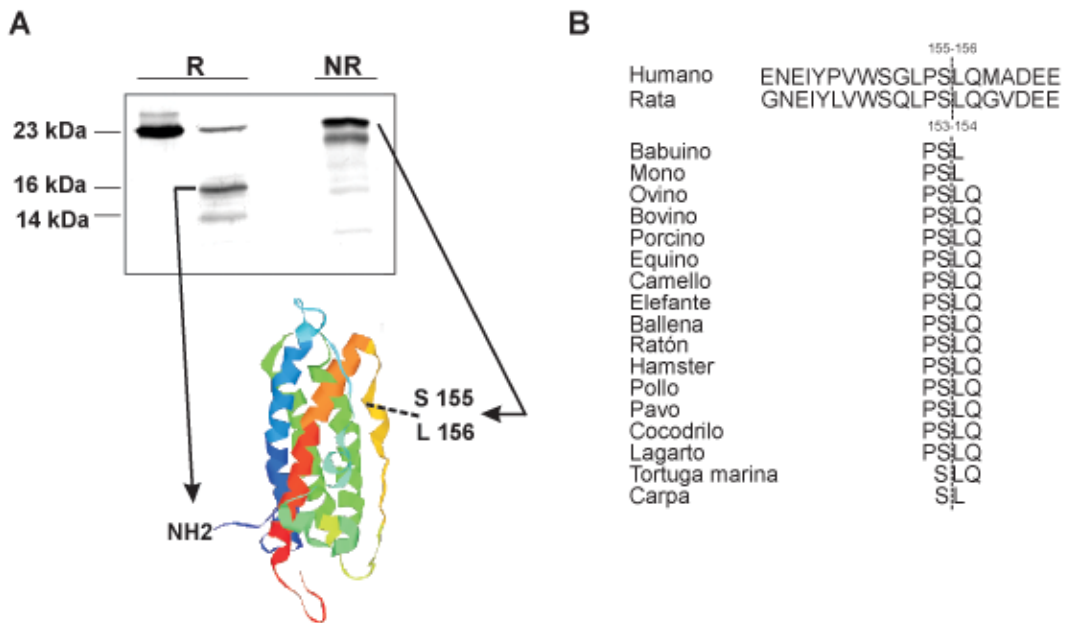


**Fig.14** Proteólisis de la PRL humana y de rata por condrocitos de rata (A), y de la PRL humana por condrocitos humanos y de rata (B). Homogenados de condrocitos de rata (2  $\mu$ g de proteína) o de humano (0.3  $\mu$ g de proteína) fueron incubados durante 24 hrs a pH 7 con 200 ng de PRL humana o de rata. Los productos proteolíticos fueron evaluados mediante Western blot bajo condiciones reductoras.

Con el propósito de identificar el sitio del corte enzimático en la molécula de PRL, se secuenciaron los extremos amino-terminales de la PRL “cortada”, el precursor de la PRL-16K. Como ya se mencionó la PRL-16K se genera a través del corte proteolítico de la PRL en el asa que forma el puente disulfuro intermedio de la molécula (ver figura 1). Esta isoforma se conoce como PRL “cortada” y posee la característica de migrar con un peso molecular aparente de 25kDa en geles de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. En la PRL “cortada” se detectan por tanto dos extremos amino-terminales, i.e., el convencional para el inicio de la PRL y el que corresponde al sitio de corte. La reducción del puente disulfuro intermedio, en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras rompe a la PRL “cortada” en dos fragmentos: el extremo amino-terminal de 16kDa y en el carboxilo terminal de 6kDa.

El análisis por medio de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras de los productos del procesamiento de la PRL por los condrocitos mostró que la mayor parte de la prolactina procesada migraba como PRL “cortada”, es decir con un peso aproximado de 25 kDa (Fig. 15A). La secuenciación del fragmento de PRL de 16kDa en condiciones reductoras y de la PRL “cortada” en condiciones no reductoras, mostraron que la proteína de 16kDa corresponde al extremo amino terminal de la PRL y que el sitio de corte se da entre los aminoácidos Ser 155 y Leu

156 en la prolactina humana y entre los aminoácidos Ser 153 y Leu 154 en la prolactina de rata (Fig.15A,B). Es importante notar que en esta región las secuencias de ambas PRLs son idénticas. Más aun, la secuencia de corte para estas proteasas se encuentra altamente conservada en prolactinas de diferentes especies de vertebrados (Fig.15B). Este hecho, aunado a que el corte ocurre a pH neutro, sugiere que este procesamiento puede ser relevante y podría ocurrir bajo condiciones fisiológicas.

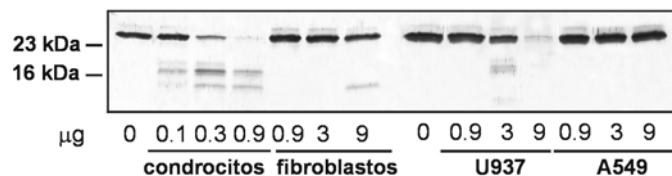


**Fig.15 Análisis de secuencia de la PRL humana cortada por condrocitos.** La PRL humana fue incubada con condrocitos y procesada mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR) y transferida a una membrana PVDF. Las bandas fueron visualizadas mediante la tinción con azul de coomassie y cortadas de la membrana. La secuencias amino-terminales fueron determinadas mediante la degradación de Edman automatizada (A). La secuencia de corte en la PRL se encuentra conservada entre los diferentes grupos de vertebrados (B).

El procesamiento de la PRL hacia PRL 16K por estas proteasas parece ser preferencial en el cartílago, ya que los condrocitos aislados de cartílago humano procesan a la PRL humana con mas eficiencia que fibroblastos humanos aislados de prepucio, una línea celular de linfoma (U937), y una línea celular derivada de un epitelio pulmonar tumoral (A549) (Fig.16). Mientras que los extractos de condrocitos

procesan a la PRL en concentraciones de 0.1  $\mu\text{g}$  de proteína, los otros tipos celulares requieren concentraciones 30 a 90 veces mayores (3 a 9  $\mu\text{g}$  de proteína) (Fig. 16).

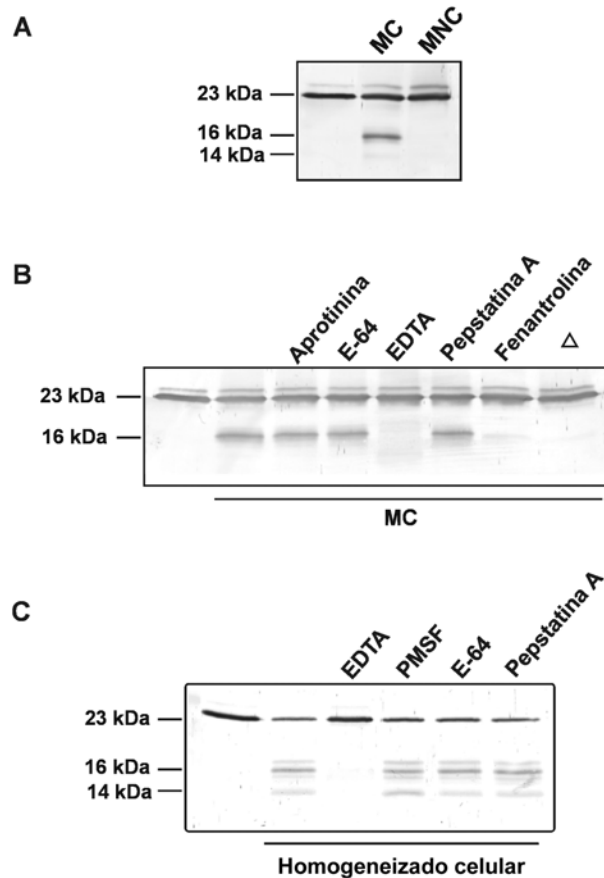
Estas diferencias aparentes en potencia de corte podrían reflejar una actividad proteolítica real, probablemente asociada con que en el cartílago se elimina la formación de vasos sanguíneos pero no en otros tejidos y que por lo tanto puede tener sentido la mayor producción de un factor antiangiogénico como la PRL-16K. Esta posibilidad deberá investigarse a través de la identificación del fragmento de PRL en el cartílago con respecto a otros tejidos vascularizados. Al respecto, estudios muy recientes han mostrado que homogeneizados de condrocitos contienen a una PRL-16K amino-terminal detectada por ensayos de Western blot revelados con anticuerpos dirigidos contra el extremo amino-terminal de la PRL pero no contra el extremo carboxilo-terminal de la hormona (Guzmán, Macotela y Clapp, resultados no publicados). Asimismo, también hemos encontrado que extractos hipofisarios contienen una PRL “cortada” entre los aminoácidos 155-156 (Cosío, Macotela, Aranda y Clapp, resultados no publicados), que muy probablemente resulta del procesamiento de la PRL por estas mismas enzimas. Por lo tanto, es posible que el procesamiento también ocurra en otros tejidos.



**Fig. 16 Proteólisis de PRL humana por homogeneizados de distintos tipos celulares humanos.** Homogeneizados de condrocitos, fibroblastos de piel, células U937 (línea celular de linfoma) y células A549 (línea celular de carcinoma de pulmón) fueron incubados durante 24 hrs a pH 7 con 200 ng de PRL humana. Los fragmentos proteolíticos fueron evaluados mediante Western blot bajo condiciones reductoras.



Con el propósito de investigar si las proteasas de los condrocitos podrían procesar a la PRL en el espacio extracelular, analizamos si estas enzimas son secretadas al medio de cultivo. Consistentemente con esta posibilidad, observamos que la incubación de PRL humana con medios condicionados por condrocitos de rata a pH 7 resultó en la generación de un fragmento de 16 kDa y, en menor proporción, uno de 14kDa, patrón similar al obtenido mediante la incubación de PRL con los homogeneizados (Fig. 17A). Por lo tanto, estos hallazgos muestran que los condrocitos secretan las proteasas neutras de PRL. Asimismo, estos hallazgos nos permiten proponer que la generación de la PRL-16K puede ocurrir en el ambiente extracelular.

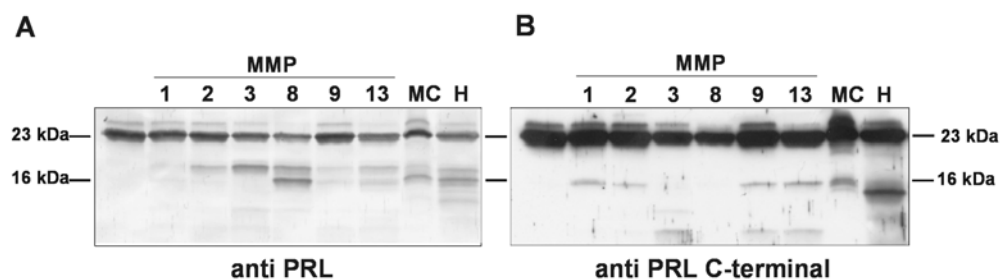


**Fig.17 El medio condicionado por los condrocitos corta a la PRL hacia PRL-16K y la actividad proteolítica es bloqueada por inhibidores de MMPs.** La PRL humana fue incubada durante 24 hrs con o sin medio condicionado (MC) o no condicionado (MNC) (A), en ausencia o presencia de distintos inhibidores de proteasas (B), o incubada con homogeneizados de condrocitos en ausencia o presencia de distintos inhibidores de proteasas (C).

Con el fin de investigar la naturaleza de las proteasas de PRL producidas y secretadas por los condrocitos, intentamos bloquear su actividad utilizando diversos inhibidores de proteasas. Observamos que el procesamiento de la PRL por el medio condicionado de condrocitos se bloqueó mediante dos inhibidores diferentes de MMPs: el EDTA y la 1,10-fenantrolina (Fig. 17B). Asimismo, como era de esperar, la inactivación por calor resultó en el bloqueo de dicha proteólisis. Otros inhibidores de proteasas no tuvieron efecto sobre la actividad proteolítica del medio condicionado (Fig. 17B) y del homogeneizado de condrocitos (Fig. 17C), incluyendo a la pepstatina A, que inhibe a la CD, así como otras proteasas de aspártico, el E64 que inhibe proteasas de cisteína, y el PMSF y la aprotinina, que inhiben proteasas de serina (Fig. 17 B y C).

Estos resultados apoyan la identidad de MMPs como las enzimas que generan a la PRL-16K en los condrocitos. Para analizar si enzimas de la familia de las MMPs son capaces de procesar a la PRL hacia PRL 16K, se incubó a la PRL humana con distintas MMPs durante 24 hrs a pH 7, y los productos de proteólisis se analizaron mediante Western blot. Todas las MMPs utilizadas son producidas y secretadas por condrocitos (Cole et al., 1996, Reboul et al., 1996, Chubinskaya et al., 1999, Tsuchiya et al., 1997) y todas ellas procesaron a la PRL predominantemente en fragmentos de 17 y 16 kDa (Fig. 18) en forma similar a los medios condicionados y homogeneizados de condrocitos. Con la diferencia de que tanto los homogeneizados y en menor proporción, los medios condicionados de condrocitos, generan además un fragmento de PRL de 14kDa. Las MMPs-8 y 13 parecen ser las más potentes, ya que su acción proteolítica fue claramente mayor y se observó con concentraciones 4 a 20 veces menores a las utilizadas para las otras MMPs.

Para identificar si los fragmentos generados por las MMPs corresponden al extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de la PRL, se utilizó el anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo carboxilo-terminal de la PRL humana (denominado INN-368) (Fig. 18B), que no reconoce al fragmento amino-terminal de 16 kDa.



**Fig.18 Proteólisis de PRL humana por distintas MMPs.** La PRL humana se incubó con MMP-1 (20ng), MMP-2 (100 ng), MMP-3 (100ng), MMP-8 (25ng), MMP-9 (100ng) y MMP-13 (5ng), además de homogeneizado (H) y medio condicionado (MC) de condrocitos, durante 24hrs. Los fragmentos derivados de la proteólisis fueron analizados mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti PRL humana (A) o un anticuerpo monoclonal que sólo reconoce el extremo carboxilo-terminal de la PRL humana (B).

Aunque todas las MMPs cortan a la PRL, los fragmentos generados presentan diferencias. La MMP-8 procesa a la PRL tanto en un fragmento de 17 kDa como en uno de 16 kDa y los dos son amino-terminales ya que fueron identificados por el anticuerpo policlonal anti-PRL (Fig. 18A), pero no por el anticuerpo monoclonal dirigido contra la región carboxilo-terminal (Fig. 18B). Más importantemente, la secuenciación de estos fragmentos mostró su naturaleza amino-terminal. Consistentemente, la secuenciación de la PRL “cortada” (PRL de 25 kDa en condiciones no reductoras), reveló que la MMP-8 corta a la PRL entre los aminoácidos 156-157, aminoácidos vecinos al sitio de corte (155-156) generado por los condrocitos, y que corresponde al fragmento amino-terminal de 17 kDa descrito (Tabla 2).

La MMP-3 procesa a la PRL a un fragmento de 17 kDa que es amino-terminal de acuerdo con su inmunoreactividad (Fig. 18), su propia secuencia y el sitio de corte (aa 156-157) de la PRL “cortada” (Tabla 2). En la PRL "cortada" también se detectaron otros cortes enzimáticos que se definen como productos amino-terminales de 11 y 4 kDa y un producto carboxilo-terminal de 7 kDa. La

contribución de este último es aparente por su inmunorreactividad con el anticuerpo monoclonal, si bien los otros productos no se detectan en condiciones reductoras por lo que su contribución no parece ser significativa. El procesamiento por las MMP-9 y 13 es similar (Fig.18). Sin embargo, no fue posible determinar la secuencia de corte generado por la MMP-9, ya que la proteólisis es limitada. La MMP-13 genera un fragmento amino-terminal de 17 kDa tanto por inmunorreactividad como por la determinación de su propia secuencia bajo condiciones reductoras, como la de la PRL "cortada" (sitio de corte entre aa 156 y 157), determinada bajo condiciones no reductoras (Tabla 2). Además, bajo condiciones reductoras la MMP-9 y la 13 producen fragmentos de 16kDa que por su inmunorreactividad podrían representar tanto el extremo amino como el carboxilo de la PRL. No hay evidencia de que la PRL-16K carboxilo-terminal se genere a partir de una PRL "cortada" ya que no se detectaron secuencias de PRL "cortada" con el sitio esperado para su generación. Sin embargo la secuenciación de la PRL "cortada" con la MMP-13 también definió un sitio de corte entre los aminoácidos 111-112, capaz de generar fragmentos amino-terminales de 11 kDa que no fueron detectados por Western blot.

Finalmente, las MMP-1 y 2 generan un fragmento amino-terminal de 17 kDa, de acuerdo con su inmunorreactividad. El sitio de corte en la PRL generado por la MMP-2 no pudo ser secuenciado, ya que al igual que en el caso de la MMP-9, la proteólisis de la PRL es muy limitada. El sitio de corte en la PRL "cortada" generado por la MMP-1 corresponde al sitio 156-157 (Fig. 18 y Tabla 2). Además, ambas enzimas cortan a la PRL en un fragmento carboxilo-terminal de 16 kDa a juzgar por su inmunorreactividad y en el caso de la MMP-1 también por su secuencia. Como en la MMP-13, la secuenciación de la PRL "cortada" generada por la MMP-1 definió un sitio de corte (aa 111-112) capaz de generar fragmentos amino-terminales y carboxilo-terminales de 11 kDa que no fueron detectados por Western blot.

En conclusión todas las MMPs generan una PRL amino-terminal de 17 kDa y un fragmento de 16 kDa que puede incluir también al extremo carboxilo-terminal. El sitio de corte para la PRL-17K generada por todas las MMPs utilizadas presenta un aminoácido de diferencia con respecto al generado por los condrocitos (156-157 vs

155-156, respectivamente). Esta diferencia podría implicar que la enzima(s) responsable de generar a la PRL en el cartílago es distinta. Sin embargo, todas estas enzimas están presentes en el cartílago y esta diferencia podría deberse a las condiciones propias del experimento que utiliza enzimas puras, aisladas de sus cofactores y de otras enzimas y componentes presentes en las células y en su medio de cultivo.

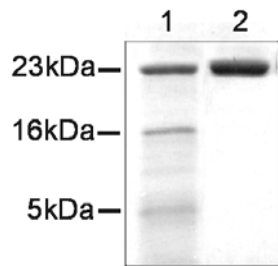
Por otra parte, se sabe que los extremos amino-terminales de 11, 14, 15, 16, 17 kDa de la PRL poseen efectos antiangiogénicos (Ferrara et al., 1991, Clapp et al., 1993, Piwnica et al., 2004), de manera que una diferencia de un aminoácido podría no tener impacto funcional sobre la generación de la forma bioactiva.

**Tabla 2. Secuencias de corte de la PRL humana por las MMPs.**

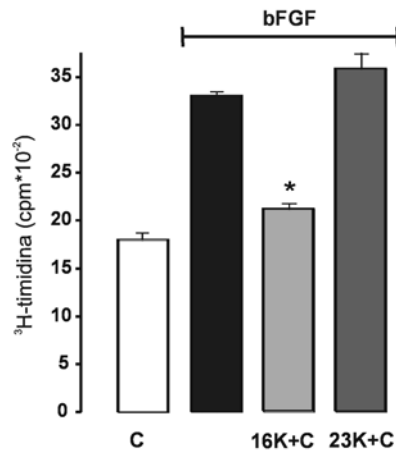
<b>MMP</b>	<b>Secuencia N-terminal de los fragmentos de 16 y 17 kDa</b>	<b>Secuencias en la prolactina cortada</b>	<b>Fragmentos esperados</b>	<b>PM esperado en kDa</b>
<b>1</b>	C-terminal 54-NSCH N-terminal 1-LPICP	1-LPICP 112-LSKAV 157-MADE	1-53 1-111 1-156 54-156 54-199	6 N 11 N 17 N 11 C 16 C
<b>2</b>	No se detectó	1-LPICP No se detectó		
<b>3</b>	N-terminal 1-LPICP C-terminal 37-FSEF	1-LPICP 112-LSKAV 37-FSEF 157-MADE	1-36 1-111 37-111 1-156	4 N 11 N 7 C 17 N
<b>8</b>	N-terminal 1-LPICP	1-LPICP 157-MADE 158-ADEE	1-156 1-157	17 N 17 N
<b>9</b>	No se detectó	1-LPICP No se detectó		
<b>13</b>	N-terminal 1-LPICP	112-LSKAV 157-MADE	1-111 1-156	11 N 17 N

Con el fin de corroborar su actividad biológica, procedimos a investigar si los productos de la proteólisis de la PRL por la acción de enzimas presentes en condrocitos, tienen efectos antiangiogénicos. Para esto, la PRL se incubó con homogeneizados de condrocitos durante 24 hrs. La mezcla de reacción conteniendo a la PRL “cortada” y a los fragmentos de PRL se redujo y se carbamidometiló para bloquear los grupos sulfidrilos, y evitar la formación de agregados por puentes disulfuro. Este procedimiento no interfiere con la bioactividad de la PRL-16K (Ferrara et al., 1991). Como control, se incubaron los condrocitos sin PRL durante 24 hrs y se añadió la PRL justo antes de la reducción y carbamidometilación para evitar la proteólisis de la hormona por los condrocitos. De esta manera, el control incluyó a la PRL íntegra y a todos los componentes de la reacción pero no a los productos de la proteólisis hormonal (Fig. 19 carril 2). Las preparaciones resultantes se muestran en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras teñidas con azul de coomassie (Fig. 19). Observamos que los fragmentos de PRL generados por los condrocitos inhibieron la proliferación de las células endoteliales estimulada por el factor de crecimiento bFGF, mientras que el control que contenía solo PRL-23K pero ningún fragmento, no tuvo efecto sobre la proliferación endotelial (Fig. 20).

Estos hallazgos muestran que los fragmentos amino-terminales de la PRL generados por los condrocitos inhiben la angiogénesis. Es posible que este efecto se deba fundamentalmente a la PRL-17K que es el fragmento mas abundante, apoyando su efecto antiangiogénico. Esta proteína es de 7 a 34 aminoácidos mayor que PRLs-16K biológicamente activas previamente descritas (Ferrara et al., 1991, Clapp et al., 1993, Struman et al., 1999), por lo que no es inesperado que posea esta acción. Lo realmente novedoso es que este fragmento se pueda generar como resultado de la acción de varias MMPs sobre un sitio de corte altamente conservado en la PRL y que dicho procesamiento pueda tener lugar bajo condiciones fisiológicas (pH 7). Esto es particularmente importante en el cartílago, donde están presentes todas esas enzimas y proponemos que la generación de la PRL-17K antiangiogénica tendría una participación importante en el mantenimiento de la avascularidad de este tejido.



**Fig. 19** Análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras de los fragmentos de PRL generados mediante la incubación de PRL humana con homogeneizados de condrocitos, reducción y carbamidometilación (carril 1). En el carril 2 se muestra el resultado de incubar condrocitos en ausencia de PRL y de agregar a la hormona inmediatamente antes de la reducción y carbamidometilación. Visualización por medio de la tinción con azul de coomassie.



**Fig.20 Los productos de la proteólisis de PRL inhiben la proliferación de las células endoteliales.** Efecto de los fragmentos de PRL (100 nM) generados mediante la incubación con condrocitos (16K+C) o de la PRL 23K+condrocitos sin incubar (23K+C), sobre la proliferación de células endoteliales de vena umbilical bovina, estimuladas con 5 ng/ml de bFGF, medida a través de la incorporación de timidina tritiada. Las preparaciones analizadas corresponden a las muestras procesadas en los carriles 1 y 2 del SDS-PAGE de la Fig. 19.\*P<0.05 vs bFGF solo.

Estos resultados abren varias posibilidades de análisis que deben ser investigadas. Por ejemplo, ¿está presente la PRL-16K en las articulaciones normales y su producción se altera bajo condiciones patológicas?, ¿cuál es la o las MMPs responsables de generar a la PRL-17K en condiciones fisiológicas y sí su actividad

disminuye o aumenta en padecimientos como la artritis reumatoide?, ¿cuál sería el origen de la PRL presente en la articulación?, etc.

Si bien es muy poco lo que se sabe en torno a estas preguntas, nuestro trabajo reciente muestra que los condrocitos normales expresan el RNAm para la PRL y que la PRL puede ser detectada en los condrocitos por inmunofluorescencia. Más aún, homogeneizados de condrocitos analizados mediante Western blot muestran la presencia de PRL y de PRL-16K amino-terminal (Guzmán, Macotela y Clapp, resultados no publicados). Por otra parte, se ha documentado la presencia de PRL en el líquido sinovial de pacientes con artritis (Hedman et al., 1992) y osteoartrósis (Ogueta et al., 2002). Esta PRL podría provenir del suero, ya que existe una correlación entre estos padecimientos y niveles altos de prolactina en la circulación (Mateo et al., 1998, Serio et al., 2002). Asimismo, la PRL podría producirse en la propia articulación artrítica. Se ha reportado que los fibroblastos sinoviales y los linfocitos infiltrados en la articulación expresan PRL (Nagafuchi et al., 1999).

En cuanto a la generación de la PRL-17K detectada en los condrocitos, nuestros resultados sugieren que la enzima(s) que la producen son MMPs. Desconocemos cual de las MMPs presentes en el cartílago podría ser la proteasa responsable. Cabe señalar que la MMP-8 sobresale como candidato posible, basado en función de su potencia y capacidad de generar a la PRL-17K. Interesantemente la MMP-8 participa en el desarrollo del cartílago y del hueso (Sasano et al., 2002), pero también se ha asociado su sobre expresión en la articulación con la patogénesis de la artritis reumatoide y la osteoartrósis (Hanemaaijer et al., 1997, Chubinskaya et al., 1996).

Dado que muchas de las MMPs se expresan normalmente en condrocitos y que funcionan regulando el desarrollo del cartílago y del hueso además de modular el recambio de la matriz extracelular del cartílago, proponemos que en condiciones normales las MMPs podrían estar generando a la PRL-16K que actuaría manteniendo la avascularidad del cartílago. Sin embargo, en condiciones patológicas, existe una



producción excesiva de MMPs (Chubinskaya et al., 1999, Vicenti y Brinckerhoff 2002), lo que conlleva a la sobredegradación de las proteínas de matriz que son indispensables para una adecuada función articular. Es posible especular que esta alta producción de MMPs podría resultar en una actividad proteolítica excesiva sobre la PRL, lo que resultaría en su degradación inespecífica y no en la generación de PRL-16K.

En apoyo a posibles funciones de la PRL y de la PRL-16K en la articulación, hemos detectado el RNA mensajero para el receptor de PRL en cultivos primarios de condrocitos, y obtenido evidencias de que tanto la PRL como la PRL-16K inhiben la apoptosis de los condrocitos inducida por la privación de suero (Macotela et al., Endo Meeting 2004). Estos hallazgos son consistentes con un efecto protector y mantenedor de la función del cartílago, a través no solo de impedir la neovascularización sino también de mantener la supervivencia de los condrocitos. El control de ambos procesos es crucial y su influencia sobre el cartílago se puede entender cuando se ilustra el proceso de osificación en el desarrollo del hueso. Para que se dé la osificación del cartílago, éste tiene que ser invadido por vasos sanguíneos, lo que resulta en la degradación de la matriz extracelular y la apoptosis de los condrocitos, y permite el reemplazo del cartílago por matriz ósea y osteoblastos.

Además, la angiogénesis del cartílago y la apoptosis de los condrocitos determinan la artritis reumatoide y la artrosis, respectivamente. La artritis reumatoide se caracteriza por una inflamación crónica en la que los nuevos vasos sanguíneos favorecen la destrucción de la articulación, a través de permitir la formación del panus, el cual se origina por un influjo excesivo de leucocitos y por la hiperproliferación de células sinoviales. Ambos tipos celulares producen citocinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas que dañan a la articulación. Además, los nuevos capilares formados son altamente permeables y causan edema, infiltración de líquido y dolor. A este respecto, ya se ha propuesto la posible participación de la PRL en la fisiopatología de la artritis reumatoide. Se ha observado que la PRL puede favorecer la formación del panus, ya que altas concentraciones de la hormona

inducen la proliferación de células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (Nagafuchi et al., 1999). Además, esta hormona actúa sobre tipos celulares de la articulación artrítica estimulando la producción de citocinas (interleucina-6 e interleucina-8) y de la MMP-3, e inhibe la producción del inhibidor de metaloproteinasas tipo-1 (TIMP-1) (Nagafuchi et al., 1999), lo que favorecería la patogenia de la artritis.

Por otra parte, en la osteoartrósis, el cartílago se destruye mediante la apoptosis de los condrocitos y puede desaparecer completamente ocasionando la fricción de los huesos, dolor y discapacidad. Tanto en la artritis reumatoide como en la osteoartrósis, las acciones de las PRLs sobre NO tendrían relevancia ya que la PRL-16K podría estimular la formación de NO por los fibroblastos sinoviales que han invadido la articulación y de esta manera ejercer efectos proinflamatorios que contribuyan a las reacciones inflamatorias y citotóxicas en la articulación. En la osteoartrósis por ejemplo, el NO liberado por los fibroblastos podría contribuir con el daño articular, ya que se sabe que el NO induce la apoptosis de los condrocitos, aunque el mecanismo aun no es del todo claro (Del Carlo y Loeser 2002).

Otro hallazgo que apoya el que las acciones de las PRLs estarán determinadas por el tipo celular y el microambiente, es el hecho de que contrariamente al efecto que ejerce sobre los fibroblastos, en los condrocitos normales encontramos que la PRL 16K no es capaz de estimular la producción de NO, mientras que las citocinas proinflamatorias si lo hacen. De manera que en los condrocitos, los efectos de las PRLs tendrían relevancia en cuanto a la regulación de la angiogénesis del cartílago y la supervivencia de los condrocitos.

En conclusión, los hallazgos de este trabajo de tesis apoyan la posible participación de las PRLs en procesos de angiogénesis e inflamación y señalan la importancia del microambiente celular para definir el tipo y dirección de los efectos. Nuestro trabajo nos permite proponer que bajo condiciones de inflamación, las citocinas proinflamatorias y la PRL-16K estimularían la expresión de iNOS y la

producción de NO promoviendo las reacciones inflamatorias. Eventualmente, por acción de las citocinas proinflamatorias se inducirían la expresión de los receptores de PRL, lo que eventualmente favorecería la inhibición de la expresión de iNOS y el consecuente retorno del NO a sus niveles basales. Adicionalmente, es posible considerar que en ciertas localidades avasculares como en el cartílago el efecto proinflamatorio de la PRL-16K no sea relevante o no ocurra. Por ejemplo, proponemos que en el cartílago la PRL-16K se genera normalmente bajo condiciones fisiológicas a consecuencia de producción basal de MMPs, pero que en condiciones de inflamación (por ejemplo, en la artritis reumatoide) o durante la degeneración del cartílago, en la osteoartrósis, la producción excesiva de MMPs, resultara en la degradación de la PRL y de la PRL-16K, lo que evitaría sus efectos antiangiogénicos y antiapoptóticos y favorecería el proceso patológico de destrucción del cartílago. Adicionalmente, en apoyo a que el tipo celular es determinante para el efecto de las prolactinas está el hecho de que mientras que en los fibroblastos la PRL 16K estimula la expresión de iNOS y la producción de NO, en los condrocitos no observamos ningún efecto del fragmento de PRL sobre la producción de NO. Asimismo, mientras que en el endotelio la PRL-16K es proapoptótica, en los condrocitos hemos encontrado que tanto la PRL-16K como la PRL actúan protegiendo a los condrocitos de la apoptosis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aktan F. 2004 iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 75:639-653.

Andries M, Tilemans D, Deneb C. 1992 Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochemical Journal* 281:393-400.

Anthony PK, Stoltz RA, Pucci ML, Powers CA. 1993 The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin (1-173), storage in secretory granules, and regulated release. *Endocrinology* 132:806-814.

Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. 1994 Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:10089-10093.

Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993 Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: Evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133:935-938.

Baldocchi RA, Tan L, Nicoll CS. 1992 Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum *in vitro*. *Endocrinology* 130:1653-1659.

Baud V, Karin M. 2001 Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends In Cell Biology* 11:372-377.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 17:639-669.

Bentzien F, Struman I, Martini FJ, Martial J, Weiner R. 2001 Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1<sup>-/-</sup> mice. *Cancer Research* 61:7356-7362.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19:225-268.

Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. 1988 Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53:69-77.

Caniggia I, Tseu I, Han RN, Smith BT, Transwell K, Post M. 1991 Spatial and temporal differences in fibroblast behavior in fetal rat lung. *American Journal of Physiology* 261:L424-L433.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.

Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. 1998 Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 248:871-878.

Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, Cole AA. 1996 Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Laboratory Investigation* 74:232-240.

Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA. 1999 Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Laboratory Investigation* 79:1669-1677.

Clapp C. 1987 Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121:2055-2064.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. 1993 The 16-kilodalton N-terminal fragment of prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.

Clapp C, Sears PS, Nicoll CS. 1989 Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* 125:1054-1059.

Clapp C, Sears PS, Russell DH, Richards J, Levay-Young BK, Nicoll CS. 1988 Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122:2892-2898.

Clapp C, Weiner RI. 1992 A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130:1380-1386.

Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. 2003 The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine Reviews* 24: 1-27.

Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE. 1996 Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 271:11023-11026.

Compton MM, Witorsch RJ. 1984 Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* 115:476-484.

Corbacho A.M\*, Macotela Y\*, Nava G., Eiserich, J.P., Cross, C.E., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. 2003 Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Letters* 544: 171-175. \*These authors contributed equally to this work.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñez Z, Noris G, Morales MA, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2000a Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *Journal of Endocrinology* 166:53-62.

Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martínez de la Escalera G, Freeman BA, Clapp C. 2000b Proteolytic cleavage confers NO synthase inducing activity upon prolactin. *Journal of Biological Chemistry* 275:13183-13186.

Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2002 Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* 173:219-238.

Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martín E, Schock BC, Kenny TP, Cross CE. 2004 Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *American Journal of Physiology (Endocrinology & Metabolism)* 287:E750-E757.

Cosío G, Jeziorski MC, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2003 Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Laboratory Investigation* 83:1-10.

Current Protocols in Molecular Biology Volume 1. Edited by Ausubel FM, et al., John Wiley & Sons, Inc. USA 1997. pp 4.9.2.

D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 1999 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Molecular Endocrinology* 13:692-704.

D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. 1995 Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the anti-angiogenic factor 16kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:6374-6378.

Davis JA, Linzer DIH. 1989 Expression of multiple forms of the prolactin receptor. *Molecular Endocrinology* 3:674-680.

Del Carlo M Jr, Loeser RF. 2002 Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis and Rheumatism* 46:394-403.

Descalzi Cancedda F, Melchiori A, Benelli R, Gentili C, Masiello L, Campanile G, Cancedda R, Albin A. 1995 Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in vitro differentiation: dependence on extracellular matrix assembly. *European Journal of Cell Biology* 66:60-68.

Di Carlo R, Bole-Feysot C, Gualillo O, Meli R, Nagano M, Kelly PA. 1995 Regulation of prolactin receptor mRNA expression in peripheral lymphocytes in rats in response to changes in serum concentrations of prolactin. *Endocrinology* 136:4713-4716.

Dueñas Z, Nava G, Rivera JC, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 1999a Detection of prolactin expression and of the prolactin receptor in ocular tissues and fluids of the rat. [Endo Soc Abstract]. Endocrine Society; 81:158. Abstract P1-112.

Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutiérrez-Ospina G, López-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 1999b Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:2498-2505.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, López-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2004 Prolactin in the eye of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45:2049-2055.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. 1998 Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molecular Aspects of Medicine* 19:221-357.

Ferrara N, Clapp C, Weiner RI. 1991 The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896-900.



- Frantz B, O'Neill EA. 1995 The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* 270:2017-2019.
- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA. 1997 Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. *Journal of Clinical Investigation* 99:1107-1117.
- Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. 1997 Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Annals of Rheumatoid Diseases* 56:542-549.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980 The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Galea E, Feinstein DL. 1999 Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB Journal* 13:2125-2137.
- Geller DA, Billiar TR. 1998 Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews* 17:7-23.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999 VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* 5:623-628.
- Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. 1996 Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews* 17:385-410.
- Griffiths JR. 1991 Are cancer cells acidic?. *British Journal of Cancer* 64:425-427.
- Gutiérrez HH, Pitt BR, Schwarz M, Watkins SC, Lowenstein C, Caniggia I, Chumley P, Freeman BA. 1995 Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators. *American Journal of Physiology* 268:L501-L508.

Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, Van Hinsbergh VW, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T. 1997 Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *Journal of Biological Chemistry* 272:31504-3159.

Hedman M, Nilsson E, De la Torre B. 1992 Low blood and synovial fluid levels of sulpho-conjugated steroids in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 10:25-30.

Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F, Kondo J. 1997 Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 272:32419-32426.

Hoffman T, Penel C, Ronin C. 1993 Glycosilation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *Journal of Endocrinology Investigation* 16:807-816.

Horseman ND, Yu-Lee LY. 1994 Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocrine Reviews* 15:627-649.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987 Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84:9265-9269.

Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S, Pober JS. 1996 A sustained reduction in I $\kappa$ B- $\beta$  may contribute to persistent NF- $\kappa$ B activation in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 271:16317-16322.

Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ. 1994 Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263:1612-1615.

- Karin M, Ben-Neriah Y. 2000 Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual Review of Immunology* 18:621-663.
- Keinanen R, Vartiainen N, Koistinaho J. 1999 Molecular cloning and characterization of the rat inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Gene* 234:297-305.
- Kelly EA, Jarjour NN. 2003 Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 9:28-33.
- Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. 2004 Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 50:131-41.
- Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH. 2003 Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Research* 63:386-393.
- Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T. 1997 Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation Research* 81:911-21.
- Kurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. 1999 Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* 140:4127-4132.
- Lavnikova N, Laskin DL. 1995 Unique patterns of regulation of nitric oxide production in fibroblasts. *Journal of Leukocyte Biology* 58:451-458.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. 1998 Inhibition of urokinase activity by the anti-angiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139:3696-3703.

Leondires MP, Hu ZZ, Dong J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. 2002 Estradiol stimulates expression of two human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 82:263-268.

Luo G, Yu-Lee LY. 1997 Transcriptional inhibition by Stat5. Differential activities at growth-related versus differentiation-specific promoters. *Journal of Biological Chemistry* 272:26841-26849.

Luo G, Yu-Lee LY. 2000 Stat5 inhibits NFkappaB-mediated signaling. *Molecular Endocrinology* 14:114-123.

Macotela Y, Mendoza C, Corbacho AM, Cosío G, Eiserich JP, Zentella A, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2002 16K prolactin induces NF-kB activation in pulmonary fibroblasts. *Journal of Endocrinology* 175:R13-R18.

Macotela Y, Zermeño C, Lavallo C, Aguilar M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2004 N-Terminal 16k-prolactin is generated by a neutral protease in chondrocytes, and prolactin and 16k-prolactin inhibit the apoptosis of chondrocytes. 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society. New Orleans, LA., USA.

Martin E, Nathan C, Xie QW. 1994 Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 180:977-984.

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. 2000 The anti-angiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular Endocrinology* 14:1536-1549.

Mateo L, Nolla JM, Bonnin MR, Navarro MA, Roig-Escofet D. 1998 High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 25:2077-2082.

Mayer B, Hemmens B. 1997 Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends In Biochemical Sciences* 22:477-481.

Mayr B, Montminy M. 2001 Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:599-609.

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

Mohtal M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI, Stedler-Stevenson WG, Goldberg GI. 1993 Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *Journal of Clinical Investigation* 92:179-185.

Montes de Oca P, Macotela Y, Nava G, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2005 Prolactin stimulates integrin mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Laboratory Investigation*. En prensa.

Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemoto S, Ono M, Fukushi J, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, Kuwano M. 2000 Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:38912-38920.

Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sanake T. 1999 Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 26:1890-1900.

Nagano M, Kelly PA. 1994 Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 269:13337-13345.

Nagase H, Woessner JF Jr. 1999 Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274:21491-21494.

Nathan C, Xie QW. 1994 Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 269:13725-13728.

Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ. 1992 Preferential mRNA expression of pro-stromelysin relative to procollagenase and in situ hybridization localization in human articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation* 89:1189-1197.

Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. 2002 Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 190:51-63.

Ohta S, Imai K, Yamashita K, Matsumoto T, Azumano I, Okada Y. 1998 Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage. *Laboratory Investigation* 78:79-87.

O'Neal KD, Yu-Lee LY. 1994 Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. Activation of interferon regulatory factor-1 and cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 269:26076-26082.

Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL, Robertson JF, Blamey RW, Kelly PA, Nicholson RI, Sutherland RL. 1997 Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:3692-3699.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM & Donner DB. 1999 NF- $\kappa$ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82-85.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987 Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.

Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L. 1987 Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *Journal of Cellular Biology* 105:2535-2541.

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Tucker C, Gerritsen ME. 1997 Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272:21096-21103.

Pi X, Zhang B, Li J, Voogt JL. 2003 Promoter usage and estrogen regulation of prolactin receptor gene in the brain of the female rat. *Neuroendocrinology* 77:187-197.

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Tucker C, Gerritsen ME. 1997 Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272:21096-21103.

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. 2004 Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: Study of their anti-angiogenic properties and physiological relevance. *Molecular Endocrinology* 18:2522-42.

Pufe T, Petersen WJ, Miosge N, Goldring MB, Mentlien R, Varoga DJ, Tillmann BN. 2004 Endostatin/collagen XVIII an inhibitor of angiogenesis is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biology* 23:267-276.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1996 The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *Journal of Clinical Investigation* 97:2011-2019.

Reyes-Reyes M, Mora N, Zentella A, Rosales C. 2001 Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- $\kappa$ B and MAPK activation through separate signaling pathways. *Journal of Cell Science* 114:1579-1589.

Robbins RA, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LDK, Wilson AJ, Adcock IM, Riveros-Moreno V, Moncada S, Polak J, Barnes PJ. 1994 Inducible nitric oxide synthase is

increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198:835-843.

Rochefort H. 1990 Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment* 16:3-13.

Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. 2000 Cathepsin D in breast: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clinical Chemical Acta* 291:157-170.

Romashkova JA & Makarov SS. 1999 NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 401:86-90.

Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H, Nakashima K. 1994 Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and estradiol. *Journal of Endocrinology* 143:383-392.

Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, Takahashi I, Onodera K, Mizoguchi I, Kagayama M. 2002 Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50:325-332.

Seriolo B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. 2002 Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966:258-262.

Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. 1997 Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis & Rheumatism* 40:2065-2074.

Sinha YN. 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 16:354-369.

Sternlicht MD, Werb Z. 2001 How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review in Cell Developmental Biology* 17:463-516.



Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. 1999 Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:1246-1251.

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Weiner RI, Martial JA, Struman I. 2003 The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Molecular Endocrinology* 17:1815-1823.

Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 1995 A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136:5454-60.

Tsuchiya K, Maloney WJ, Vu T, Hoffman AR, Huie P, Sibley R, Schurman DJ, Smith RL. 1997 Osteoarthritis: Differential expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in non-fibrillated and fibrillated cartilage. *Journal of Orthopedic Research* 15:94-100.

Tzeng SJ, Linzer DIH. 1997 Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Molecular Reproduction & Development* 48:45-52.

Vincenti MP, Brinckerhoff CE. 2002 Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Research* 4:157-164.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. 1998 MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-422.

Wang F, Samudio I, Safe S. 2001 Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17 $\beta$ -estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Molecular & Cellular Endocrinology* 172:91-103.

Wang YF, Walker AM. 1993 Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology* 133:2156-2160.

Wang YF, Yu-Lee LY. 1996 Multiple stat complexes interact at the interferon regulatory factor-1 interferon-gamma activation sequence in prolactin-stimulated Nb2 cells. *Molecular & Cellular Endocrinology* 121:19-28.

Whiteside ST, Israel A. 1997 I $\kappa$ B proteins: structure, function and regulation. *Seminars in Cancer Biology* 8:75-82.

Wink DA, Mitchell JB. 1998 Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 25:434-456.

Won JS, Lee JK, Suh HW. 2001 Forskolin inhibits expression of inducible nitric oxide synthase mRNA via inhibiting the mitogen activated protein kinase in C6 cells. *Brain Research (Molecular Brain Research)* 89:1-10.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994 Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 269:4705-4708.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. 1998 The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396:15-17.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. 2003 Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36:128-137.

Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. 2000 Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Annals of Rheumatoid Diseases* 59:455-461.

Yu-Lee LY. 1997 Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 215:35-52.

Yu-Lee LY, Luo G, Brook ML, Morris SM. 1998. Lactogenic hormone signal transduction. *Biology of Reproduction* 58:295-301.

## RAPID COMMUNICATION

# 16K Prolactin induces NF- $\kappa$ B activation in pulmonary fibroblasts

Y Macotela<sup>1</sup>, C Mendoza<sup>2</sup>, AM Corbacho<sup>1,3</sup>, G Cosío<sup>1</sup>,  
JP Eiserich<sup>3</sup>, A Zentella<sup>2</sup>, G Martínez de la Escalera<sup>1</sup> and  
C Clapp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado postal 1-1141, Juriquilla-Querétaro, Qro, 76001 México

<sup>2</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, University of California at Davis, California 95616, USA

(Requests for offprints should be addressed to C Clapp; Email: clapp@servidor.unam.mx)

### Abstract

The amino-terminal 16 kDa fragment of prolactin (16K PRL) promotes the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) accompanied by the production of nitric oxide (NO) by rat pulmonary fibroblasts. The present study was designed to elucidate whether the mechanism by which 16K PRL promotes iNOS expression involves the activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), a key transcription factor for iNOS induction. 16K PRL stimulated DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B in pulmonary fibroblasts as demonstrated by gel shift assays. Likewise, fluorescence immunocytochemistry showed that

16K PRL promotes nuclear translocation of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B. Finally, treatment with 16K PRL induced the degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor  $\kappa$ B-beta (I $\kappa$ B- $\beta$ ), and such degradation was prevented by blocking I $\kappa$ B- $\beta$  phosphorylation. Altogether, these results show that 16K PRL activates NF- $\kappa$ B nuclear translocation via the phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B- $\beta$ . These findings are consistent with NF- $\kappa$ B being part of the signal transduction pathway activated by 16K PRL to induce iNOS expression.

*Journal of Endocrinology* (2002) **175**, R13–R18

### Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous biological mediator with effects on smooth muscle relaxation, neurotransmission, host defense, immunity and inflammation. NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays critical roles in modulating inflammation and responses to infectious and degenerative diseases. iNOS expression is induced by a variety of immunologic and inflammatory stimuli, including pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], tumor necrosis factor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ]) and lipopolysaccharides (LPS). The expression of iNOS appears to be species and cell-type specific and involves a complex interplay of various transcriptional factors, including NF- $\kappa$ B (Xie *et al.* 1994). Inactive NF- $\kappa$ B is normally bound to a family of cytoplasmic proteins called inhibitors of kappa B (I $\kappa$ B), which mask the NF- $\kappa$ B nuclear localization signal and prevent its translocation from the cytoplasm to the nucleus. Cytokine-mediated NF- $\kappa$ B activation requires the phosphorylation and degradation of the I $\kappa$ B proteins, followed by NF- $\kappa$ B

nuclear translocation. Once in the nucleus, NF- $\kappa$ B binds to specific DNA sequences on the iNOS gene and activates iNOS transcription (Karin & Ben-Neriah 2000, Xie *et al.* 1994).

Recently, a specific fragment of the hormone prolactin (PRL) was found to induce iNOS expression (Corbacho *et al.* 2000). PRL is a pleiotropic protein that acts as both a circulating hormone and cytokine on physiological processes that range from reproduction and osmoregulation to immunomodulation (Bole-Feysot *et al.* 1998). PRL can be proteolytically cleaved to form a 16 kDa N-terminal fragment (16K PRL). This proteolytic cleavage adds diversity to the already varied functions of PRL, since 16K PRL has unique effects not shared with the parent molecule. 16K PRL, but not PRL, acts as a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo* (Clapp *et al.* 1993, Dueñas *et al.* 1999) and *in vitro*, inhibiting endothelial cell proliferation (Clapp *et al.* 1993) and stimulating type 1 plasminogen activator inhibitor expression (Lee *et al.* 1998) and endothelial cell apoptosis (Martini *et al.* 2000). In addition, 16K PRL, but not PRL, promotes the expression of iNOS

and NO production by pulmonary fibroblasts, acting as a pro-inflammatory cytokine. Finally, the unique effects of 16K PRL appear to occur through a receptor distinct from known PRL receptors, as specific, high affinity, saturable binding sites for 16K PRL are found in endothelial cells and fibroblasts (Clapp *et al.* 1992, Corbacho *et al.* 2000). However, the molecular identity of 16K PRL receptors and their associated signaling pathways remain to be elucidated. Here, we demonstrate that 16K PRL activates the NF- $\kappa$ B signaling pathway in pulmonary fibroblasts. This finding is consistent with our previous observations demonstrating that 16K PRL stimulates the expression of iNOS in the same cell type.

## Materials and Methods

### Materials

Reagents were obtained from the following sources: recombinant murine TNF- $\alpha$  from R&D Systems (Minneapolis, MN); Inhibitor of the I $\kappa$ B kinases (BAY 11-7085 (E)3-[(4-*t*-Butylphenyl) sulfonyl]-2-propenenitrile) from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); anti-p65, anti-I $\kappa$ B $\alpha$  and anti-I $\kappa$ B $\beta$  polyclonal antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); goat anti-rabbit antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and to horseradish peroxidase (HP) from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA); and polymyxin B from Sigma (St Louis, MO). 16K PRL was generated after the enzymatic proteolysis of PRL with a particulate fraction from rat mammary glands, gel filtration, and carbamidomethylation, as described (Clapp 1987).

### Cell culture

Rat lung fibroblasts were isolated from Sprague-Dawley rat fetuses of 19–20 days of gestational age (Cannigia *et al.* 1991). Cells were cultured on Ham's F12 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Cells grown to confluence were incubated with Ham's F12 medium-0.5% FBS and treated with 16K PRL (160–1600 ng/ml) in the presence or absence of polymyxin B (10  $\mu$ g/ml). TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) was used as a positive control of NF- $\kappa$ B activation.

### Preparation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)

Cells were centrifuged at 800 *g* for 5 min, pellets were frozen, resuspended in hypotonic buffer (Hepes 10 mM, pH 7.9; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; DTT 1 mM) and centrifuged after a 5 min incubation. The nuclear pellets were resuspended in extraction buffer (Hepes 20 mM, pH 7.9; NaCl 400 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; PMSF 0.5 mM;

glycerol 25%, DTT 1 mM), incubated 30 min at 4 °C with gentle mixing, centrifuged at 1500 *g* and the supernatants diluted with an equal volume of nuclear extraction buffer (Hepes 20 mM, pH 7.9; KCl 50 mM; EDTA 0.2 mM; PMSF 0.5 mM; DTT 1 mM). EMSA was performed as described previously (Reyes *et al.* 2001). Briefly, 10  $\mu$ g of nuclear protein extract was incubated with 1  $\mu$ g of poly dI-dC and 5000–10 000 c.p.m. of a <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide probe (AGTTGAGGGGACTTTCCCA GG; the NF- $\kappa$ B consensus sequence appears underlined; Santa Cruz Biotechnology). After a 20 min incubation at RT, unbound and complexed probe were separated using a native 4% polyacrylamide gel.

### Immunofluorescence

Pulmonary fibroblasts grown on glass cover slips (10<sup>5</sup> cells per well in 15 mm well plates) were incubated in the absence (control) or presence of TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) for 20 min, or of 16K PRL (160 ng/ml) for 2 h, the latter in the absence or presence of polymyxin B (10  $\mu$ g/ml). After treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed and incubated with 10% normal goat serum in 0.6% Triton-PBS for 2 h, followed by an overnight incubation at RT with 2  $\mu$ g/ml of anti-p65 NF- $\kappa$ B subunit antibodies. Preparations were then incubated with a 1:100 dilution of goat anti-rabbit antibodies conjugated to FITC for 1 hr at RT. Omission of primary antibodies or substitution with rabbit pre-immune antibodies confirmed the specificity of the reaction.

### Western blot

Fibroblasts were homogenized in lysis buffer (0.01 M Tris-HCl, 0.14 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 8, with aprotinin at 0.2 U/ml and 1 mM PMSF). Homogenates corrected for their protein concentration were subjected to reducing SDS-PAGE (12%) and the proteins were electroblotted onto nitrocellulose and detected by using enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford IL) with 1  $\mu$ g/ml of anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  or anti-I $\kappa$ B- $\beta$  polyclonal antibodies, followed by a 1:15 000 dilution of anti-HP conjugates. Optical density values were determined using the 1D image analysis software v3.5 (Eastman Kodak company, Rochester NY).

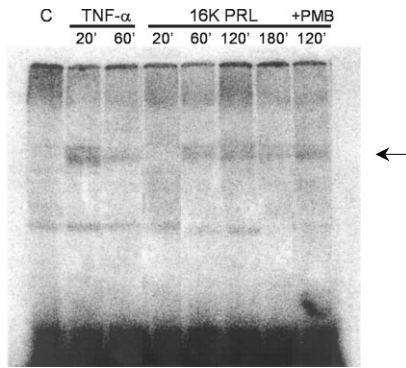
### Data analysis

All results were replicated in three or more independent experiments. Values were compared with a one way analysis of variance, followed by a Duncan range test.

## Results

### 16K PRL stimulates DNA binding activity of NF- $\kappa$ B

The DNA binding activity of NF- $\kappa$ B in pulmonary fibroblasts was investigated after treatment with 16K PRL



**Figure 1** Gel shift assay (EMSA) showing that 16K PRL stimulates DNA binding activity of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in primary fetal lung fibroblasts. Cells were incubated in the absence (C) or presence of TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) or 16K PRL (160 ng/ml) with or without polymyxin B (PMB) (10  $\mu$ g/ml), for the indicated times before preparation of nuclear extracts for gel retardation analysis with  $^{32}$ P-labeled consensus DNA sequence oligonucleotide for NF- $\kappa$ B. Specificity of the reaction was assessed using a 100-fold excess of unlabeled NF- $\kappa$ B oligonucleotide as competitor (not shown). Specific complex is indicated (arrow).

and compared with that resulting from incubation with TNF- $\alpha$ , a known activator of NF- $\kappa$ B (Baud & Karin 2001) (Fig. 1). Nuclear extracts prepared from replicate cultures of pulmonary fibroblasts treated for various times with either peptide were assayed for NF- $\kappa$ B binding in an EMSA of DNA binding factors using a radiolabeled consensus sequence  $\kappa$ B probe containing the core  $\kappa$ B site. Both TNF- $\alpha$  and 16K PRL induced the formation of a similar nuclear complex, albeit with different kinetics. With TNF- $\alpha$  the complex was formed rapidly ( $\leq 20$  min) and declined after 60 min of treatment (Fig. 1). In contrast, with 16K PRL the complex was initially detected at 60 min, was stronger at 120 min, and declined by the 180 min time point (Fig. 1). Specificity of the DNA-protein interaction for NF- $\kappa$ B was demonstrated by competition with a 100-fold excess of unlabeled oligonucleotide (not shown). Because LPS is a known stimulator of NF- $\kappa$ B activation (Xie *et al.* 1994), we ascertained the effect of 16K PRL in the presence of polymyxin B (PMB), an inhibitor of endotoxin activity. PMB did not interfere

with the formation of the nuclear complex elicited by 16K PRL (Fig. 1), suggesting that 16K PRL alone is an effective activator of NF- $\kappa$ B.

#### 16K PRL induces the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B

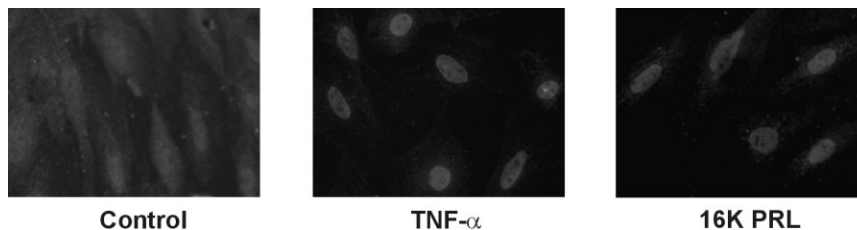
The cellular distribution of NF- $\kappa$ B was studied in pulmonary fibroblasts using fluorescence immunocytochemistry and polyclonal antibodies against the p65 subunit of NF- $\kappa$ B (Fig. 2). In the absence of treatment, p65 immunoreactivity was homogeneously distributed throughout the cytoplasm and nuclei of cells. Treatment with 16K PRL induced the specific localization of p65 immunostaining in the cell nucleus and this redistribution was similar to that induced by TNF $\alpha$  (Fig. 2).

#### 16K PRL induces I $\kappa$ B- $\beta$ degradation

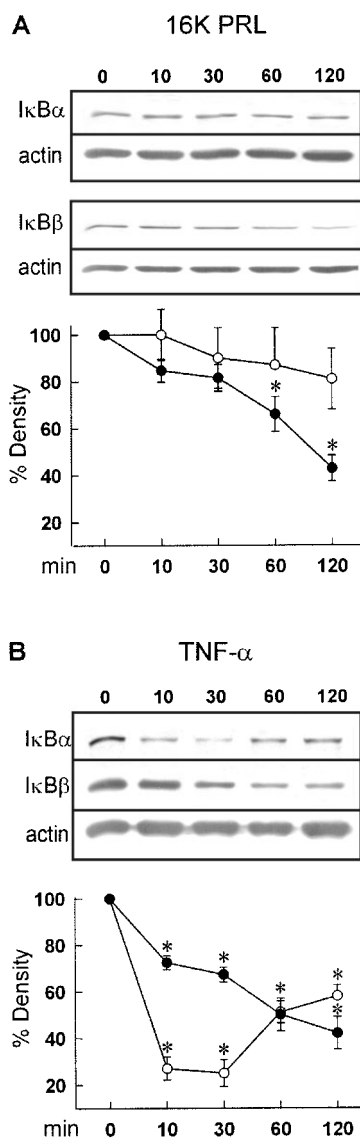
The I $\kappa$ B family consists of three members, I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , and I $\kappa$ B- $\epsilon$  (Karin & Ben-Neriah 2000) which can respond differentially to NF- $\kappa$ B-inducing signals and inhibit NF- $\kappa$ B with different efficiencies (Simeonidis *et al.* 1999). We have measured the intracellular degradation kinetics of I $\kappa$ B isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  in pulmonary fibroblasts treated with TNF- $\alpha$  or 16K PRL for the indicated time periods (Fig. 3). The degradation of the individual I $\kappa$ B proteins was followed in cellular lysates by Western blots with isoform-specific antibodies. 16K PRL did not alter I $\kappa$ B- $\alpha$  levels at the times analyzed. However, 16K PRL induced a gradual degradation of I $\kappa$ B- $\beta$  that was maximal by the 120 min time point (Fig. 3A). This kinetics of I $\kappa$ B- $\beta$  degradation was similar to that after TNF- $\alpha$  treatment (Fig. 3B). Nevertheless, in contrast to 16K PRL, TNF- $\alpha$  also induced a rapid ( $\leq 10$  min) and transient degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , with the protein beginning to be recovered by the 60 min time point.

#### 16K PRL induces degradation of I $\kappa$ B- $\beta$ through the activation of I $\kappa$ B kinases

Degradation of I $\kappa$ B proteins requires their phosphorylation at Ser residues by I $\kappa$ B kinases (IKK). Phosphorylated I $\kappa$ Bs

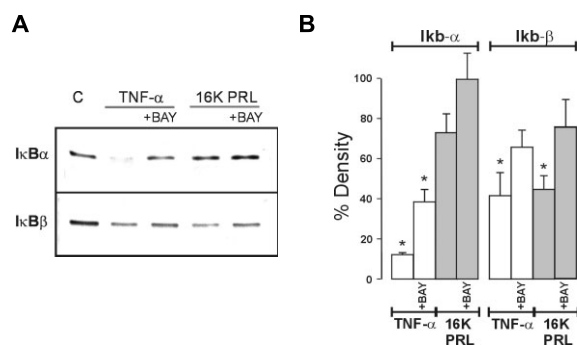


**Figure 2** 16K PRL induces nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in fibroblasts. Immunofluorescence detection of NF- $\kappa$ B (p65) in fibroblasts cultured in the absence (control) or presence of TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) for 20 min or of 16K PRL (160 ng/ml) for 2 hrs.



**Figure 3** 16K PRL induces I $\kappa$ B- $\beta$  degradation in fibroblasts. Cells were treated with or without 16K PRL (160 ng/ml) (A) or TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) (B) for the times indicated and cellular lysates subjected to Western blot. Degradation of the I $\kappa$ B isoforms was visualized with anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  (○) or anti-I $\kappa$ B- $\beta$  (●) antibodies. Membranes were re-blotted with anti-actin antibodies. I $\kappa$ B values were quantitated densitometrically, normalized with respect to the actin signal and plotted as percent of value at 0 min. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P$ <0.05 vs. 0 min.

are polyubiquitinated and subsequently degraded by the proteasome (Karin & Ben-Neriah 2000). An inhibitor of IKKs (BAY 117085) that blocks I $\kappa$ B phosphorylation (Pierce *et al.* 1997) prevented the degradation of I $\kappa$ B- $\beta$  induced by 16K PRL (Fig. 4). Likewise, BAY 117085 interfered with the degradation of both I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$  induced by TNF- $\alpha$  (Fig. 4).



**Figure 4** Inhibitor of I $\kappa$ B kinases (BAY 11-7085) blocks 16K PRL-induced degradation of I $\kappa$ B- $\beta$ . (A) Western blot analysis of untreated cells (C) or of cells treated with TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) for 20 min or 16K PRL (160 ng/ml) for 2 h with or without a 30 min pre-treatment with 1 mM of BAY11-7085. Degradation of the I $\kappa$ B isoforms was visualized with anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  and anti-I $\kappa$ B- $\beta$  antibodies. (B) Density of I $\kappa$ B bands was plotted as percent of untreated control. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P$ <0.05 vs untreated control.

## Discussion

The N-terminal 16 kDa fragment of PRL may function as a new regulatory cytokine. It inhibits angiogenesis via direct effects on endothelial cells (Corbacho *et al.* 2002), and has pro-inflammatory actions via the stimulation of iNOS expression and NO production in pulmonary fibroblasts (Corbacho *et al.* 2000). Although these effects are clear, the molecular identity of the 16K PRL receptor is unknown, and its associated signaling pathways remain to be elucidated.

The current study shows that 16K PRL is able to stimulate the signaling cascade leading to NF- $\kappa$ B activation in pulmonary fibroblasts. This conclusion is based on the use of four independent methods. First, EMSA analysis detected NF- $\kappa$ B binding activity in nuclear extracts from cells treated with 16K PRL. Second, fluorescence immunocytochemistry demonstrated the accumulation of NF- $\kappa$ B-like immunoreactivity in the nuclei of 16K PRL treated cells. Third, 16K PRL induced the degradation of the I $\kappa$ B- $\beta$  protein, a degradation known to be required for NF- $\kappa$ B activation. Finally, treatment with an inhibitor of I $\kappa$ B phosphorylation prevented the degradation of I $\kappa$ B induced by 16K PRL. Therefore, these observations indicate that 16K PRL can stimulate the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and promote its DNA-binding activity via the phosphorylation and subsequent degradation of I $\kappa$ B- $\beta$ .

Along with 16K PRL treatment, parallel studies were carried out with TNF $\alpha$  as a control for NF- $\kappa$ B activation. The results from these comparative studies indicated that the timescale of nuclear translocation and the I $\kappa$ B isoforms recruited during NF- $\kappa$ B activation differed between the two peptides. 16K PRL-dependent NF- $\kappa$ B activation was detected by 60 min and reached a maximal level by

120 min. This behavior resembles the activation of NF- $\kappa$ B in response to growth factors, such as platelet derived growth factor (PDGF). In fibroblasts treated with PDGF, NF- $\kappa$ B translocation is detected 60 min after stimulation and reaches a maximal level by 180 min (Romanshikova & Madarov 1999). In contrast, TNF- $\alpha$  dependent NF- $\kappa$ B activation was fast and reached a maximal level by 20 min consistent with previous reports for TNF- $\alpha$  (Ozes *et al.* 1999). In addition, 16K PRL-dependent NF- $\kappa$ B activation was linked to degradation of the I $\kappa$ B- $\beta$  isoform, while for TNF- $\alpha$  both I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$  were degraded. Interestingly, degradation only of the I $\kappa$ B- $\beta$  isoform has been reported in persistent or biphasic NF- $\kappa$ B activation (Thompson *et al.* 1995). The functional implications of these differences are unknown. However, it has been suggested that variations in the kinetics of NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B degradation vary among cytokines and cell types and may have an impact on NF- $\kappa$ B regulated genes at later times (Johnson *et al.* 1996). Altogether, it appears that the 16K PRL-dependent NF- $\kappa$ B activation resembles a more persistent effect of growth and surviving factors such as PDGF rather than the transient effect of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ .

The activation of NF- $\kappa$ B by 16K PRL may relate to its pro-inflammatory effects. NF- $\kappa$ B orchestrates the activation of numerous genes involved in the control of a variety of inflammatory responses. These include those genes encoding cytokines, chemokines, growth factors, immunoreceptors, cell adhesion molecules, and regulators of apoptosis and inflammation (Pahl 1999). One such target gene is the iNOS gene. Activation of NF- $\kappa$ B is required for cytokine induction of the iNOS gene (Xie *et al.* 1994) and the iNOS promoter contains NF- $\kappa$ B binding sites that are functionally important for the transcriptional activation of iNOS (Taylor *et al.* 1998). Moreover, various second messenger pathways that lead to iNOS expression converge in the activation of NF- $\kappa$ B (Taylor *et al.* 1998). Therefore, the mechanism by which 16K PRL promotes iNOS expression in pulmonary fibroblasts is likely to involve NF- $\kappa$ B activation. Nevertheless, expression of other genes may also result from NF- $\kappa$ B activation by 16K PRL. In this regard the noted similarities between 16K PRL and PDGF kinetics of NF- $\kappa$ B activation allow us to speculate on survival-related genes as putative candidates. In addition, these similarities may suggest that 16K PRL-dependent NF- $\kappa$ B activation can act to sustain the inflammatory response initiated by stimuli such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

Further work is needed to completely elucidate the signal transduction pathway that leads to the activation of NF- $\kappa$ B by 16K PRL. The signaling pathway activated by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  for NF- $\kappa$ B activation has been described. It involves two adaptor proteins, TNF- $\alpha$  receptor-associated factor 2 (TRAF-2) and factor 6 (TRAF-6), that function for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  signaling, respectively. Both TRAF-2 and TRAF-6 can lead to the

activation of NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK), a serine/threonine protein kinase that can form a complex with and activates the I $\kappa$ B kinase signalosome complex (Karin & Ben-Neriah 2000). The activated I $\kappa$ B kinase signalosome complex phosphorylates I $\kappa$ B, directing it for proteasome-mediated degradation and allowing NF- $\kappa$ B to translocate to the nucleus and activate gene expression.

Other second messenger pathways can converge in the activation of NF- $\kappa$ B to induce iNOS expression. For example, protein kinase C-stimulating agents or cyclic AMP (cAMP) elevating agents can activate NF- $\kappa$ B and are efficient inducers of iNOS expression (Kleinert *et al.* 1996). However, while NF- $\kappa$ B appears to be a key control element for the induction of iNOS in response to these second messenger systems (Kleinert *et al.* 1996), cAMP can also upregulate iNOS directly via cAMP regulatory elements within the iNOS promoter (Eberhardt *et al.* 1996). Recent data suggest that activation of cAMP dependent signaling can contribute to upregulation of iNOS by 16K PRL. Accordingly, treatment of pulmonary fibroblasts with H89, a specific inhibitor of protein kinase A (PKA), reduced the stimulatory effect of 16K PRL on NO production (Macotela and Clapp, unpublished observation).

In summary, 16K PRL activates NF- $\kappa$ B in primary pulmonary fibroblasts. This effect may lead to upregulation of the iNOS gene but also of other NF- $\kappa$ B target genes. Because pulmonary fibroblasts produce PRL and can locally process PRL into 16K PRL (Corbacho *et al.* 2000), these actions of 16K PRL may involve autocrine mechanisms. This study helps support the proposed role of 16K PRL as a putative cytokine involved in inflammatory and host defense processes and warrants further investigation.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Autonomous University of Mexico (PUIS and IN226799), the National Council of Science and Technology (T34309N and 36041N) and the Howard Hughes Medical Institute (55000595). A Corbacho was supported by a research training fellowship from the American Lung Association. The authors thank F López-Barrera, G Nava and M García Servín for their expert technical assistance, and D D Pless for editing the manuscript.

## References

- Baud V & Karin M 2001 Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* **11** 372–377.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Review* **19** 225–268.



- Caniggia I, Tseu I, Han RN, Smith BT, Transwell K & Post M 1991 Spatial and temporal differences in fibroblast behavior in fetal rat lung. *American Journal of Physiology* **261** L424–L433.
- Clapp C 1987 Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121** 2055–2064.
- Clapp C & Weiner RI 1992 A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130** 1380–1386.
- Clapp C, Martial JA, Guzman R, Rentier-Delrue F & Weiner RI 1993 The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133** 1292–1299.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martí nez de la Escalera G, Freeman BA & Clapp C 2000 Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of Biological Chemistry* **275** 13183–13186.
- Corbacho AM, Martí nez de la Escalera G & Clapp C 2002 Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* **173** 219–238.
- Dueñas Z, Torner L, Corbacho A, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martí nez de la Escalera G & Clapp C 1999 Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16k-Da prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **40** 1–8.
- Eberhardt W, Kunz D, Hummel R & Pfeilschifter J 1996 Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **223** 752–756.
- Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S & Pober JS 1996 A sustained reduction in I $\kappa$ B- $\beta$  may contribute to persistent NF- $\kappa$ B activation in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **271** 16317–16322.
- Karin M & Ben-Neriah Y 2000 Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual Review of Immunology* **18** 621–663.
- Kleinert H, Euchenhofner C, Ihrig-Biedert I & Forstermann U 1996 In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *The Journal of Biological Chemistry* **271** 6039–6044.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J & Weiner RI 1998 Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor expression. *Endocrinology* **139** 3696–3703.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA & Weiner RI 2000 The anti-angiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular Endocrinology* **14** 1536–1549.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM & Donner DB 1999 NF- $\kappa$ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401** 82–85.
- Pahl HL 1999 Activators and targets genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* **18** 6853–6866.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Tucker C & Gerritsen ME 1997 Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **272** 21096–21103.
- Reyes-Reyes M, Mora N, Zentella A & Rosales C 2001 Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- $\kappa$ B and MAPK activation through separate signaling pathways. *Journal of Cell Science* **114** 1579–1589.
- Romashkova JA & Makarov SS 1999 NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* **401** 86–90.
- Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA & Thanos D 1999 Mechanisms by which I $\kappa$ B proteins control NF- $\kappa$ B activity. *PNAS* **96** 49–54.
- Taylor BS, De Vera ME, Ganster RW, Wang O, Shapiro RA, Morris Jr RM, Billiar TR & Geller DA 1998 Multiple NF- $\kappa$ B Enhancer Elements Regulate Cytokine Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *The Journal of Biological Chemistry* **273** 15148–15156.
- Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Ghosh S 1995 I $\kappa$ B- $\beta$  regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* **80** 573–582.
- Xie Q, Kashiwabara Y & Nathan C 1994 Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 4705–4708.

# Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts

Ana M. Corbacho<sup>a,b,1</sup>, Yazmin Macotela<sup>a,1</sup>, Gabriel Nava<sup>a</sup>, Jason P. Eiserich<sup>b</sup>,  
Carroll E. Cross<sup>b</sup>, Gonzalo Martínez de la Escalera<sup>a</sup>, Carmen Clapp<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla-Querétaro, Qro. 76001, Mexico*

<sup>b</sup>*Divisions of Pulmonary and Critical Care Medicine and nephrology, Department of Internal Medicine, University of California at Davis, Davis, CA 95616, USA*

Received 19 February 2003; revised 28 March 2003; accepted 14 April 2003

First published online 13 May 2003

Edited by Beat Imhof

**Abstract** Prolactin (PRL) has been implicated as a modulator of immune function, and some of its actions may be linked to NO synthesis. Because NO acts as a mediator of inflammation, we speculated that an inflammatory milieu could unmask pathways by which PRL could affect NO synthesis. Here, we show that pro-inflammatory cytokines induce the expression of PRL receptors in pulmonary fibroblasts, allowing PRL to inhibit cytokine-induced NO production and the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS). Inhibition of iNOS expression by PRL correlates with the phosphorylation of STAT-5b (signal transducer and activator of transcription 5b) and the suppression of expression of IRF-1 (interferon regulatory factor 1), a transcription factor for iNOS. These results reveal previously unrecognized mechanisms by which PRL and PRL receptors may play significant modulatory roles during immune-inflammatory processes.

© 2003 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

**Key words:** Prolactin; Prolactin receptor; Nitric oxide; iNOS; Pro-inflammatory cytokine; STAT-5b; IRF-1

## 1. Introduction

NO is a gaseous biological mediator with effects on smooth muscle relaxation, neurotransmission, host defense, immunity and inflammation [1–3]. NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays critical roles in modulating inflammation and responses to infectious and degenerative diseases [3]. iNOS expression is induced by a variety of immunologic and inflammatory stimuli, including pro-inflammatory cytokines (e.g. interleukin 1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], tumor necrosis factor  $\alpha$  [TNF $\alpha$ ], interferon  $\gamma$  [IFN $\gamma$ ]) and lipopolysaccharides.

Prolactin (PRL) acts as a circulating hormone and as a cytokine, eliciting a wide variety of actions [4]. Moreover,

PRL can be proteolytically cleaved to generate 16K PRL, a PRL fragment with potent anti-angiogenic properties [5,6]. We have recently shown that 16K PRL stimulates iNOS expression and NO production by rat pulmonary fibroblasts [7], resembling the action of pro-inflammatory cytokines. Unlike 16K PRL and consistent with undetectable PRL receptors, PRL showed no effect on either iNOS expression or NO synthesis in these pulmonary cells [7]. Since NO acts as a mediator of inflammation, we speculated that an inflammatory milieu could uncover PRL actions on iNOS expression in pulmonary fibroblasts, which are important cells in inflammatory reactions of the lung. Here, we investigate the effects of PRL on NO production and iNOS expression in pulmonary fibroblasts treated with a combination of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ), and we analyze the receptors and signal transduction pathways involved. Our findings reveal previously unrecognized anti-inflammatory properties of PRL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Rat pituitary PRL was from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP). Recombinant murine IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), angiotensin II (Ang II) and platelet-derived growth factor (PDGF) were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). IRF-1 (interferon regulatory factor 1) cDNA and anti-STAT-5b (signal transducer and activator of transcription 5b) rabbit polyclonal antibody were kindly provided by L.-Y. Yu-Lee (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) [8], and anti-phosphotyrosine (anti-pY) monoclonal antibody was a gift of C. Rosales (UNAM, Mexico City, Mexico) [9].

### 2.2. Cell culture

Rat pulmonary fibroblasts were isolated from Sprague–Dawley rat fetuses as previously described [10]. Cells were grown in Ham's F-12 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HI FBS), and experiments were performed in Ham's F12 containing 0.5% HI FBS. Unless otherwise stated, for all experiments fibroblasts were pre-treated for 6 h with 2.5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN $\gamma$  and 12.5 ng/ml TNF $\alpha$  and further incubated with 10 nM rat PRL for 24 h.

### 2.3. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and treated with RNase-free DNase for 15 min at 37°C followed by phenol–chloroform extraction. Reverse transcription was performed using 5  $\mu$ g of total RNA, 5  $\mu$ M oligo(dT)<sub>16</sub> primers, and MMLV retrotranscriptase (Invitrogen) at 37°C for 1 h. For PRL receptors, a common forward primer (5'-ATCCTGGGAGATGG-AGGAC-3') and a common reverse primer (5'-ATCCACACGGTT-

\*Corresponding author. Fax: (52)-442-234 0344.

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

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** PRL, prolactin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ ; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; STAT-5b, signal transducer and activator of transcription 5b; IRF-1, interferon regulatory factor 1

GTGTCCTTC-3') were used to detect the short, intermediate and long isoforms. Reverse primers that specifically detect the short (5'-TGGCTGAGGCTGACAAAAGAG-3') or long (5'-AGACAGTG-GGGCTTTTCTCCT-3') isoform were also used. For iNOS detection, the forward primer 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3' and the reverse primer 5'-CTCCTGCCCACTGAGTT CGTC-3' were employed. Messenger RNAs for ribosomal protein L19 (RPL19) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were amplified as internal controls. For RPL19, forward and reverse primers were 5'-CGAAATCGCCAATGCCAACTC-3' and 5'-TGCTCCATGAGAA-TCCGCTTG-3', respectively. For G6PDH, forward primer 5'-GA-CCTGCAGAGCTCCAATCAAC-3' and reverse primer 5'-CACGA-CCCTCAGTACCAAAGGG-3' were used. Conventional PCR was performed as previously described [11], using 40 cycles for iNOS and PRL receptors, and 21 cycles for RPL19 and G6PDH. Real-time PCR was carried out using RPL19 or G6PDH as internal standards, in reactions that contained 1  $\mu$ l aliquots of the reverse transcription reaction described above, 7.5  $\mu$ l of Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany) and 400 nM forward and reverse primers in 15  $\mu$ l total volume. Detection and data analyses were carried out on a LightCycler Instrument according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

#### 2.4. Nitrite and nitrate assay

The oxidation products of  $\cdot$ NO, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) were determined in cell culture media by the Griess reaction as previously described [12].

#### 2.5. Western blot and immunoprecipitation

To determine the tyrosyl-phosphorylation of STAT-5b, fibroblasts were pre-treated with cytokines for 6 h and incubated in the absence or presence of 10 nM PRL for 30 min. A combination of immunoprecipitation and Western blot analyses was performed as previously described [13]. Briefly, cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.2% sodium deoxycholate, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM NaF). Lysates were centrifuged and pre-cleared with protein-A beads for 1 h, then incubated with anti-STAT-5b antibody (2  $\mu$ g/ml) overnight. 60  $\mu$ l of protein-A beads was added, and the immunoprecipitated proteins were resolved on 7.5% SDS-PAGE. Membranes were probed with anti-pY antibodies (5  $\mu$ g/ml) and re-probed with anti-STAT-5b (2  $\mu$ g/ml) antibodies.

#### 2.6. Northern blot

To detect IRF-1 mRNA, 10  $\mu$ g of RNA extracted from fibroblasts was denatured and electrophoresed in a denaturing formaldehyde/1% agarose gel. Northern blotting was performed using a 1.5 kb fragment of a specific cDNA probe for rat IRF-1 labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The blots were re-probed with  $^{32}$ P-RPL19 cDNA as an internal standard for RNA loading.

#### 2.7. Statistical analysis

All results were replicated in three or more independent experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed by the unpaired Student's *t*-test.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results and discussion

Based on the hypothesis that an inflammatory milieu would unmask PRL actions on NO synthesis, we analyzed PRL effects on NO production by resting versus cytokine-stimulated pulmonary fibroblasts (Fig. 1A). Consistent with previous observations [7], PRL did not modify basal NO levels in the untreated cells (lower curve). However, in cells pre-treated with a mixture of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , known to act synergistically to stimulate NO production [12], PRL produced a significant ( $P \leq 0.05$ ) inhibition of NO synthesis in a dose-dependent manner (upper curve, Fig. 1A). Inhibition by PRL was similar to effective doses of TGF $\beta$  (0.4–10 nM), Ang II (10 nM) and PDGF (0.4–10 nM), three known inhib-

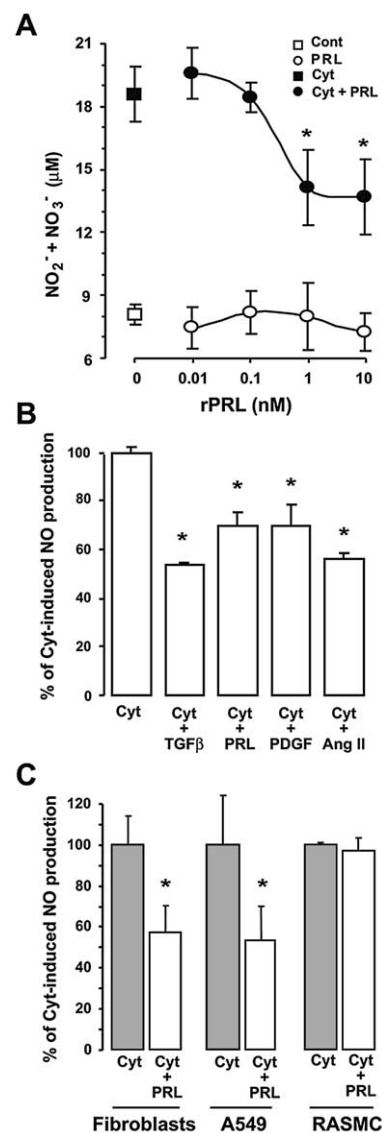


Fig. 1. A: PRL inhibits cytokine-induced NO production in a dose-dependent manner in rat pulmonary fibroblasts. B: Comparative effect of PRL (10 nM), TGF $\beta$  (0.4 nM), Ang II (10 nM) and PDGF (0.4 nM) on cytokine-induced NO production by rat pulmonary fibroblasts. C: PRL effect on cytokine-induced NO production by rat pulmonary fibroblasts, A549 human lung epithelial cells and rat aortic smooth muscle cells (RASMC). For all experiments, cells were pre-treated for 6 h with or without cytokines (2.5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN $\gamma$  and 12.5 ng/ml TNF $\alpha$ ) and further incubated with PRL (10 nM), TGF $\beta$ , Ang II or PDGF for 24 h. NO production was measured by accumulation of  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  in the culture medium. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. \* $P \leq 0.05$  versus cytokines alone (Cyt).

itors of cytokine-induced NO [14–16] (Fig. 1B). Finally, PRL inhibition was not restricted to rat pulmonary cells, as it also occurred in the A549 human lung epithelial cell line; however, rat aortic smooth muscle cells were not affected (Fig. 1C).

Consistent with the inhibition of NO production, conventional and real-time RT-PCR showed that PRL significantly decreased ( $P \leq 0.05$ ) cytokine-induced iNOS expression, but not basal expression (Fig. 2). While cytokines induced a 16-fold increase in iNOS mRNA, PRL decreased the cytokine effect four-fold (Fig. 2B). However, the magnitude of the reduction of iNOS mRNA did not correlate well with that of

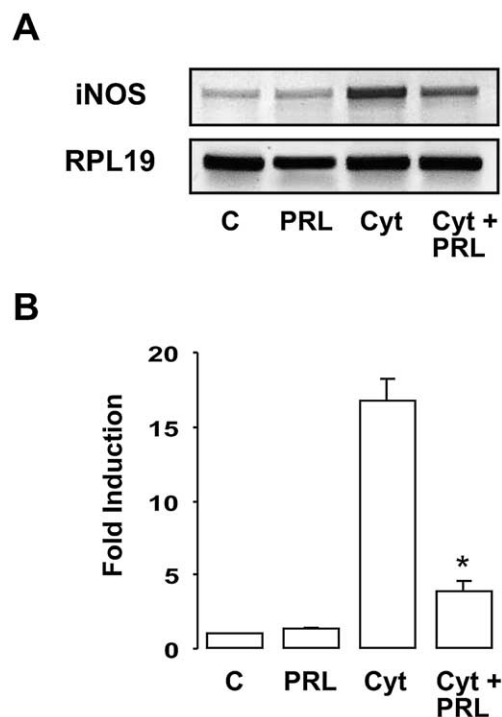


Fig. 2. PRL inhibits cytokine-induced iNOS expression in rat pulmonary fibroblasts. A: iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR performed on total RNA extracted from cells. Amplification of RPL19 is shown as control. B: Quantitation of iNOS mRNA expression using real-time PCR. Cells were pre-treated for 6 h with or without cytokines (2.5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN $\gamma$  and 12.5 ng/ml TNF $\alpha$ ), and then incubated in the absence or presence of 10 nM PRL for 24 h. \* $P$  < 0.05 versus cytokines alone (Cyt).

NO (Fig. 1). The reason for this difference is unclear but may reflect the fact that the NO measured represents the accumulation of stable NO metabolites over time, whereas iNOS mRNA can have a short, 1 h half-life [17], and its values reflect a point in time after PRL treatment.

We previously showed that the expression of PRL receptors in resting fibroblasts is undetectable [7]; however, here we show that PRL is able to inhibit cytokine-induced iNOS expression and NO production in the same cell type. Hence, we hypothesized that the cytokines used to induce iNOS also induce the expression of PRL receptors that in turn could mediate PRL action. To address this possibility, we investigated the expression of PRL receptors in cytokine-treated cells. While PRL receptors were not detected in control fibroblasts, either in the absence or presence of PRL, the expression of the long PRL receptor isoform was markedly induced by cytokine treatment (Fig. 3). The mRNA for the short PRL receptor was not detectable. In support of these findings, analysis by real-time PCR showed an approximately six-fold induction of the long PRL receptor by cytokine treatment, both in the absence and presence of PRL (Fig. 3B). Therefore, the combination of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  acts to promote the expression of PRL receptors in pulmonary fibroblasts, enabling PRL to inhibit cytokine-induced iNOS expression.

To characterize the mechanisms underlying PRL effects on iNOS expression, the activation of the classical signal transduction pathway associated with the PRL receptor was investigated. The interaction of PRL with its receptor leads to the downstream phosphorylation of STAT factors, primarily

STAT-5 or STAT-1 [4]. Phosphorylated STAT-5 or STAT-1 homo-dimerize and translocate to the nucleus, where they regulate the transcription of specific genes, including IRF-1 [18]. While STAT-1 can activate IRF-1 [13,19], STAT-5 can inhibit IRF-1 transcription [8,20,21]. In fact, IRF-1 is one of the transcription factors that activates the iNOS promoter [22,23]. Here, we investigated the extent of phosphorylation of the STAT-5b protein and the levels of IRF-1 mRNA in fibroblasts treated with PRL. Consistent with the absence of functional PRL receptors, treatment with PRL alone did not increase STAT-5b phosphorylation (Fig. 4A); however, after cytokine treatment, PRL stimulated STAT-5b phosphorylation, when compared with control cells or cells treated with cytokines alone (Fig. 4A). These results suggest that after cytokine treatment, pulmonary fibroblasts express functional PRL receptors and become responsive to PRL signaling as determined by STAT-5b tyrosine phosphorylation. Furthermore, PRL inhibited cytokine-induced IRF-1 expression (Fig. 4B). While similar basal levels of IRF-1 mRNA were observed in the absence of cytokines, a clear induction of IRF-1 was observed after cytokine treatment (Fig. 4B). This result was expected since IFN $\gamma$  is known to induce IRF-1 [22]. Remarkably, PRL was able to counteract the effect of the cytokine treatment by reducing IRF-1 mRNA levels (Fig.

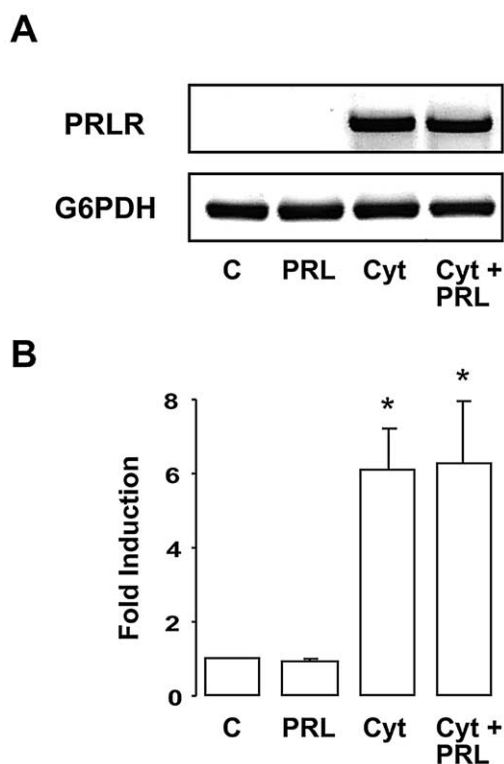


Fig. 3. Pro-inflammatory cytokines induce the expression of the long PRL receptor in rat pulmonary fibroblasts. A: The mRNA for the long PRL receptor was analyzed by RT-PCR performed on total RNA. Amplification of G6PDH is shown as control. B: Quantitation of mRNA for the long PRL receptor using real-time PCR. Cells were pre-treated for 6 h with or without cytokines (2.5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN $\gamma$  and 12.5 ng/ml TNF $\alpha$ ) and then incubated for 24 h in the absence or presence of 10 nM PRL. For both figures: untreated control cells (C), PRL alone (PRL), cytokines alone (Cyt) and cells pre-treated with cytokines and further incubated with PRL (Cyt+PRL). \* $P$  < 0.05 versus basal and PRL-treated controls.

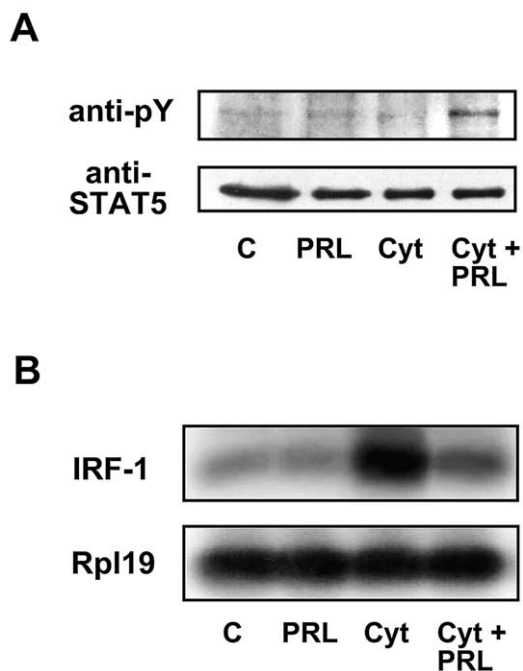


Fig. 4. PRL induces STAT-5b phosphorylation and inhibits IRF-1 expression in cytokine-treated fibroblasts. A: STAT-5b phosphorylation was induced by PRL in cytokine-treated cells. Cells were pre-treated with cytokines for 6 h and further incubated for 30 min with or without 10 nM PRL. Proteins were immunoprecipitated with anti-STAT-5b antibody and immunoblotted with anti-pY antibody (upper panel) and anti-STAT-5b antibody (lower panel). B: Northern blot analysis for IRF-1. Cells were pre-treated with cytokines for 6 h and further incubated with 10 nM PRL for 24 h. For both figures, cytokines were 2.5 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN $\gamma$  and 12.5 ng/ml TNF $\alpha$ . Groups were as follows: untreated control cells (C), PRL alone (PRL), cytokines alone (Cyt) and cells pre-treated with cytokines and further incubated with PRL (Cyt+PRL).

4B). These results show for the first time in a non-genetically modified primary culture cell type that PRL acts to induce STAT-5b activation and to inhibit the expression of IRF-1. Because IRF-1 is one of the transcription factors required for iNOS expression [22,23], PRL inhibition of IRF-1 could explain the downstream PRL inhibitory effect on iNOS mRNA observed in fibroblasts. These findings agree with a previously proposed mechanism by which phosphorylated STAT-5b can inhibit the induction of the IRF-1 via protein–protein interactions and competition for limiting transcriptional co-activators [8,21].

In conclusion, our results demonstrate that PRL acts to inhibit cytokine-induced iNOS expression and NO production by rat pulmonary fibroblasts. The PRL effect appears to be mediated by cytokine-induced PRL receptors, which upon activation lead to the phosphorylation of STAT-5b and the inhibition of IRF-1 expression. To our knowledge, the present findings represent the first evidence in which up-regulation of the PRL receptor occurs in response to pro-inflammatory cytokines and is a requirement for any PRL action.

The PRL inhibitory effect on cytokine-induced NO production and iNOS expression occurs in pulmonary cells (fibroblasts and epithelial) from different species (rat and human) but not in other cell types (rat smooth muscle cells). These findings suggest that the lung is a site for the anti-inflammatory effect of PRL. However, in other cells PRL can activate

NO synthesis. Previous investigations have shown that PRL elevates NO production in mouse macrophages [24] and induces iNOS expression in human leukocytes [25] and in rat C6 glioma cells [26]. Opposite effects are not unexpected since the regulation of iNOS expression is complex and known to be cell- and species-specific [27]. For example, regulatory factors, such as retinoic acid and TGF $\beta$ , can either inhibit [28–30] or potentiate [31–33] iNOS expression, depending on the cell type investigated.

This study, together with our previous work [7], reveals that PRL and 16K PRL have dichotomous effects on NO production by rat pulmonary fibroblasts. While 16K PRL acts as a pro-inflammatory cytokine inducing the expression of iNOS in resting conditions, PRL acts as an anti-inflammatory factor, attenuating the cytokine-induced iNOS expression. The fact that pro-inflammatory cytokines induced the expression of PRL receptors further supports the idea that the inhibitory effect of PRL is secondary to the action of pro-inflammatory cytokines, and it suggests that relevant PRL functions may become apparent during the inflammatory process. Because NO acts as a mediator of inflammation [3], the outcome of the hormonal effect could promote or inhibit the inflammatory response, depending on the activity of the proteases responsible for processing PRL into 16K PRL and on the selective expression of the receptors for each PRL isoform.

**Acknowledgements:** We thank F. López-Barrera, M. García, A. Prado and D. Mondragón for their expert technical assistance, and D.D. Pless for editing the manuscript. This work was supported by Howard Hughes Medical Institute Grant 55000595, the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) Grants 36041-N and 34309-N, the National Autonomous University of Mexico Grants PUIS and IN227502 (to C.C.); the UC-MEXUS-CONACYT Grant CN-02-92 (to C.C. and J.P.E.) and the American Lung Association (ALA and ALAC-Research Program, Post-doctoral Fellowship to A.M.C.).

## References

- [1] Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. and Napoli, C. (1999) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 879–886.
- [2] Moncada, S. (1997) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811, 60–67.
- [3] Nathan, C. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2417–2423.
- [4] Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P.A. (1998) *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- [5] Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. and Weiner, R.I. (1993) *Endocrinology* 133, 1292–1299.
- [6] Corbacho, A.M., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2002) *J. Endocrinol.* 173, 219–238.
- [7] Corbacho, A.M., Nava, G., Eiserich, J.P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martínez de la Escalera, G., Freeman, B.A. and Clapp, C. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 13183–13186.
- [8] Luo, G. and Yu-Lee, L.-Y. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26841–26849.
- [9] Sanchez-Mejorada, G. and Rosales, C. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 27610–27619.
- [10] Caniggia, I., Tseu, I., Han, R.N., Smith, B.T., Transwell, K. and Post, M. (1991) *Am. J. Physiol.* 261, L424–L433.
- [11] Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. (1999) *J. Endocrinol.* 161, 423–432.
- [12] Gutierrez, H.H., Pitt, B.R., Schwarz, M., Watkins, S.C., Lowenstein, C., Caniggia, I., Chumley, P. and Freeman, B.A. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, L501–L508.
- [13] Wang, Y.-F. and Yu-Lee, L.-Y. (1996) *Mol. Cell. Endocrinol.* 121, 19–20.
- [14] Perrella, M.A., Yoshizumi, M., Fen, Z., Tsai, J.-C., Hsieh, C.-M., Kourembanas, S. and Lee, M.-E. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14595–14600.

- [15] Nakayama, I., Kawahara, Y., Tsuda, T., Okuda, M. and Yokoyama, M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 11628–11633.
- [16] Kunz, D., Walker, G., Eberhardt, W., Messmer, U.K., Huwiler, A. and Pfeilschifter, J. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2800–2809.
- [17] Gustafsson, A.B. and Brunton, L.L. (2000) *Mol. Pharmacol.* 58, 1470–1478.
- [18] Yu-Lee, L.-Y. (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 35–52.
- [19] O'Neal, K.D. and Yu-Lee, L.-Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 26076–26082.
- [20] Yu-Lee, L.-Y., Luo, G., Book, M.L. and Morris, S.M. (1998) *Biol. Reprod.* 58, 295–301.
- [21] Luo, G. and Yu-Lee, L.-Y. (2000) *Mol. Endocrinol.* 14, 114–123.
- [22] Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J., Mark, T.W., Taniguchi, T. and Vilcek, J. (1994) *Science* 263, 1612–1615.
- [23] Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 977–984.
- [24] Kumar, A., Mahendra Singh, S. and Sodhi, A. (1997) *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 129–133.
- [25] Dogusan, Z., Hooghe, R., Verdood, P. and Hooghe-Peters, E.L. (2001) *J. Neuroimmunol.* 120, 58–66.
- [26] Raso, G.M., Meli, R., Gualillo, O., Pacilio, M. and Di Carlo, R. (1999) *J. Neurochem.* 73, 2272–2277.
- [27] Teng, X., Zhang, H., Snead, C. and Catravas, J.D. (2002) *Am. J. Physiol.* 282, C144–C152.
- [28] Datta, P.K. and Lianos, E.A. (1999) *Kidney Int.* 56, 486–493.
- [29] Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J. and Srimal, S. (1990) *J. Immunol.* 145, 940–944.
- [30] Vodovotz, Y. (1997) *Nitric Oxide* 1, 3–17.
- [31] Austenaa, L.M. and Ross, A.C. (2001) *J. Leukoc. Biol.* 70, 121–129.
- [32] Gilbert, R.S. and Herschman, H.R. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 380–384.
- [33] Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihring-Biedert, I. and Förstermann, U. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6039–6044.