



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Campus UNAM-Juriquilla, Qro.

**ANÁLISIS DEL EFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE LA
PROLACTINA SOBRE EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

QFB JESSICA GUZMÁN MORALES

DIRECTOR DE TESIS

DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA

Juriquilla, Querétaro

2008



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 dirección del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y la asesoría de la Dra. Carmen Clapp, contando 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 tutor: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por la libertad que me confió y su apoyo constante. A la Dra. Carmen Clapp por todo lo que de ella he aprendido y por su dedicación.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Mauricio Díaz y Dr. Jesús Chimal por sus importantes aportaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis sinodales: Dra. Carmen Mejía, Dra. Carmen Aceves, Dr. Jorge Meléndez, Dra. María Masri y Dr. Andrés Quintanar por sus valiosas críticas y comentarios a la tesis.

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

A S. Ivonne Perales por su entusiasta apoyo para la realización de los experimentos. Gracias por tu ejemplo, te recordaré siempre.

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

A los diversos servicios de apoyo del INB representados por el M.V.Z. Martín García, la Lic. Pilar Galarza, la Lic. Lourdes Lara, Evelyn Flores y Carmen Vásquez.

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

A mi familia y amig@s que me han acompañado y apoyado a través del tiempo y la distancia.

*Au futur qui s'offre à moi grâce à ces quelques feuilles...
...et au passé auquel elles font allusion*

Dedicatoria

*A mis padres Graciela y Bernardo,
a mi hermana Verónica,
a mi esposo Carlos.*

ÍNDICE

ABSTRACT	
1	
RESUMEN	
2	
GLOSARIO	
3	
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Generalidades del cartílago	4
1.2 Osificación endocondral	5
1.3 Cartílago articular y condrocitos	7
1.4 Degradación del cartílago	8
1.5 Apoptosis de condrocitos e inflamación	10
1.6 PRL, receptor de PRL y vías de señalización	11
1.7 PRL como molécula anti-apoptótica	13
1.8 Modelo de hiperprolactinemia	13
1.9 PRL en la articulación sinovial	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS	17
5.1 Prolactina, anticuerpos y citocinas	17
5.2 Procesamiento histológico de la articulación	17
5.3 Inmunohistofluorescencia para PRL	17

5.4 Aislamiento y cultivo de condrocitos	18
5.5 Inmunoprecipitación-Western blot	18
5.6 RT-PCR	19
5.7 Inmunohistoquímica para el receptor de PRL	19
5.8 Evaluación de apoptosis <i>in vitro</i>	20
5.9 Inyecciones intra-articulares	20
5.10 Inducción de hiperprolactinemia	20
5.11 ELISA para cuantificar PRL en la circulación	21
5.12 Evaluación de apoptosis <i>in situ</i>	21
5.13 Análisis de imágenes	21
5.14 Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1 La PRL se encuentra en el cartilago y es producida y secretada por los condrocitos	23
6.2 Los condrocitos expresan la isoforma larga del receptor de la PRL	26
6.3 La PRL tiene acción anti-apoptótica sobre los condrocitos	27
7. CONCLUSIONES	42
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO	

ABSTRACT

Articular cartilage is an avascular tissue consisting of a single cell type known as chondrocytes. In pathologies such as rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) where cartilage is destroyed, the death of chondrocytes by apoptosis has been reported as a primary event. Prolactin (PRL) is a hormone with anti-apoptotic properties present in synovial fluid and found at high circulating levels in patients with RA and OA. In this project we hypothesized that PRL is an inhibitor of chondrocyte apoptosis.

Our results show that PRL is produced and proteolytically processed to amino-terminal fragments with antiangiogenic properties (vasoinhibins (Vi)) by chondrocytes. Chondrocytes isolated from rat femoro-tibial joints express the messenger RNA (mRNA) of PRL and immunoreactive PRL proteins of 23 and 16 kDa. Immunoreactive PRLs were also detected *in situ* by immunohistofluorescence. Furthermore, in support of the direct effects of PRL on chondrocytes, we found that cultured chondrocytes express the mRNA for PRL receptor and that the protein corresponds to the long isoform. In addition, PRL receptor was detected in chondrocytes *in situ* by immunohistochemistry. Importantly, we showed by two different methodologies evaluating DNA fragmentation (ELISA and TUNEL) that PRL blocks the apoptosis of cultured chondrocytes induced by serum deprivation. Finally, we obtained *in vivo* evidence that PRL reverses the pro-apoptotic effect of the pro-inflammatory cytokines when co-injected into the femoro-tibial joint, or when PRL blood levels are increased in the circulation of rats by grafting two anterior pituitary glands under the kidney capsule. The latter effect was prevented by blocking the PRL release with the dopaminergic agonist bromocriptine. Altogether, these data demonstrate that PRL and its receptor are expressed by chondrocytes and that PRL can act as a survival factor for these cells. This research highlights the potential preventive and therapeutic value of PRL in arthropaties characterized by cartilage degradation.

RESUMEN

El cartílago es un tejido avascular constituido por un sólo tipo celular, los condrocitos. En enfermedades como la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA), donde existe una degradación del cartílago, se ha reportado la muerte de los condrocitos por apoptosis como uno de los eventos primarios. La prolactina (PRL) es una hormona con propiedades anti-apoptóticas presente en el líquido sinovial y se encuentra en altas concentraciones en la circulación de pacientes con AR y OA. En este trabajo investigamos la hipótesis de que la PRL es un inhibidor local de la apoptosis de los condrocitos.

Los resultados obtenidos durante esta investigación mostraron que en los condrocitos se producen tanto la PRL, como sus fragmentos amino-terminales con propiedades anti-angiogénicas, las vasoinhibinas (Vi). Los condrocitos aislados de la articulación femoro-tibial de la rata expresan el ARN mensajero de la hormona, así como proteínas inmunorreactivas de 23 y 16 kDa. Dichas PRLs inmunorreactivas también fueron detectadas en condrocitos *in situ* mediante inmunofluorescencia. Además, y en apoyo a la idea de que la PRL tiene efectos directos sobre los condrocitos, encontramos que condrocitos en cultivo expresan el ARN mensajero para el receptor de PRL (RPRL) y que la proteína corresponde a la isoforma larga. Más aún, el RPRL fue detectado en condrocitos *in situ* por inmunohistoquímica. De forma destacable, demostramos por dos diferentes metodologías que evalúan la fragmentación de ADN (ELISA y TUNEL), que la PRL bloquea la apoptosis inducida por la privación de suero en condrocitos en cultivo. Finalmente, obtuvimos evidencia *in vivo* de que la PRL revierte el efecto pro-apoptótico de citocinas pro-inflamatorias cuando se co-inyectan en la articulación femoro-tibial, o cuando los niveles de PRL son aumentados en la circulación de las ratas al implantar dos adenohipófisis bajo la cápsula renal. Este efecto fue prevenido al bloquear la liberación de PRL con el agonista dopaminérgico bromocriptina. En resumen, estos resultados demuestran que la PRL y su receptor son expresados por los condrocitos, y que la PRL actúa como promotor de la sobrevivencia de este tipo celular. Esta investigación resalta el potencial valor preventivo y terapéutico de la PRL en artropatías caracterizadas por la degradación del cartílago.

GLOSARIO

AR	artritis reumatoide
BSA	<i>albúmina serica bovina</i>
citomix	IL-1 β + IFN- γ + TNF- α
DAPI	diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas
HA	hipófisis anterior
IFN- γ	interferón-gamma
IL-1 β	interleucina-1beta
IRF-1	factor regulado por interferón-1
I κ B	inhibidor del NF κ B
JAK	quinasas Janus
MMPs	metaloproteasas de matriz
NF κ B	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
OA	osteoartritis
PBS	amortiguador de fosfatos salino pH 7.4
PRL	prolactina
RPRL	receptor de prolactina
SFB	suero fetal bovino
STAT-3	transductor de señal y activador de la transcripción-3
TNF- α	factor de necrosis tumoral-alfa
TUNEL	marcaje por dUTP en el corte terminal de ADN
Vi	vasoinhibinas

1. INTRODUCCIÓN

Los condrocitos son las únicas células que conforman el cartílago y son las responsables de la formación, mantenimiento y recambio de toda la variedad de proteínas de la matriz extracelular. Los condrocitos son esenciales para la función del tejido y su muerte es un factor importante durante el crecimiento de los huesos largos (Poole, 1991). El envejecimiento y la enfermedad pueden llevar a la degradación del cartílago articular (Aigner y McKenna, 2002). Diversas evidencias sugieren que los condrocitos mueren principalmente por apoptosis. Se ha detectado apoptosis en condrocitos asociados a patologías como la artritis reumatoide (Kim y Song, 1999) y la osteoartritis (Kouri *et al.*, 1997). Además se ha encontrado una correlación directa entre la presencia de apoptosis y la severidad del daño al cartílago articular (Hashimoto *et al.*, 1998).

En este trabajo de tesis investigamos si la prolactina (PRL) se produce en los propios condrocitos, y si podría ser parte de los factores que regulan la sobrevivencia del cartílago. La PRL es multifuncional y tiene efectos anti-apoptóticos en varios tipos celulares (Bailey *et al.*, 2004, Ahonen *et al.*, 1999, Krumenacker *et al.*, 1998). Esta hormona, además de producirse en la hipófisis anterior, se expresa y secreta por varios tejidos extrahipofisarios (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). De hecho, se ha documentado la presencia de la PRL en la articulación bajo distintas condiciones patológicas (Nagafuchi *et al.*, 1999; Ogueta *et al.*, 2002). Sin embargo, se desconoce si esta hormona tiene influencia en la fisiología del cartílago articular.

A continuación se conforma el marco teórico del presente estudio a través de revisar aspectos generales de la fisiología del cartílago, de la apoptosis de los condrocitos, y de la PRL y sus vías de señalización.

1.1. Generalidades del cartílago

El cartílago representa aproximadamente el 1% del peso seco del cuerpo y realiza varias funciones (Manicourt *et al.*, 1999). Se forma por un proceso de concentración de células mesenquimales, seguida de su diferenciación hacia condrocitos (Bi *et al.*, 1999). Existen tres

tipos de cartílago de acuerdo con su contenido de proteínas fibrosas, clasificándose en: elástico, fibroso y hialino. El cartílago elástico además de colágena tipo II, contiene fibras elásticas, y se localiza en el pabellón auricular, en las paredes del canal auditivo externo, en las trompas de Eustaquio y en la epiglotis de la laringe. Es amarillento y presenta mayor elasticidad y flexibilidad que el hialino. Su principal diferencia con este último es que la matriz presenta un entretejido denso de finas fibras elásticas con propiedades basófilas. El cartílago fibroso contiene colágena de los tipos I y II. Es un componente de los discos intervertebrales, de los meniscos, de las uniones de los tendones a los huesos y de las uniones entre los huesos planos de la pelvis. El cartílago hialino es el más abundante del cuerpo, y contiene únicamente colágena tipo II. Se encuentra en el esqueleto nasal, la laringe, la tráquea, los bronquios, las costillas y los extremos articulares de los huesos. Forma el esqueleto fetal y durante el desarrollo provee soporte estructural y sirve de guía para el crecimiento de los huesos mediante la llamada osificación endocondral.

1.2. Osificación endocondral

Durante el desarrollo, el molde cartilaginoso genera un periostio y en el centro un collar, en el que los osteoblastos depositan hueso. Poco después de la aparición del collar óseo, el cartílago comienza a calcificarse formándose un centro de osificación primario. Simultáneamente a la osificación endocondral que avanza desde la diáfisis hacia las epífisis, se forma la cavidad medular y el hueso crece en longitud. La diáfisis que una vez fue una masa sólida de cartílago hialino es sustituida por hueso compacto. Cuando los vasos penetran en las epífisis, se forma un centro de osificación secundario, a partir del cual el proceso de osificación es similar al producido en el centro primario. Estos centros de osificación secundarios suelen aparecer en el momento del nacimiento, con la diferencia de que se forma hueso esponjoso y no se desarrolla una cavidad medular. En los extremos de las epífisis queda una porción remanente de cartílago, constituyendo el cartílago articular, y entre las epífisis y la diáfisis se mantiene la placa epifisaria o placa de crecimiento, también cartilaginosa, a partir de la cual el hueso irá creciendo durante el desarrollo del niño, hasta desaparecer en la edad adulta. Es importante resaltar la diferencia entre los condrocitos del cartílago articular y los de

la placa de crecimiento, ya que los primeros se mantienen latentes y los de la placa se diferencian para volverse hipertróficos y finalmente morir. La placa de crecimiento constituye así el lugar a partir del cual el hueso puede crecer en longitud durante la infancia y adolescencia. En ella se distinguen varias zonas (Gertner, 1999) que se suceden (Fig. 1) y cuyo mantenimiento está finamente concertado por distintas moléculas entre las que se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), “indian hedgehog/parathyroid hormone-like hormone” (Ihh/PthIh) y “bone morphogenetic protein 7” (BMP7) (Minina *et al.*, 2002). Estas regiones son las siguientes:

- La zona de cartílago en reposo, que está ubicada próxima a la epífisis, y que contiene condrocitos dispersos que no proliferan y que sirven de punto de anclaje, uniendo la epífisis a la diáfisis
- La zona de cartílago en proliferación, que es una lámina formada por condrocitos ligeramente mayores que los de la zona anterior, los cuales se encuentran apilados y sometidos a procesos mitóticos muy activos. Como consecuencia de esta mitosis, la capa se engruesa y toda la placa crece longitudinalmente
- La zona de cartílago hipertrófico o maduro, la cual contiene condrocitos aún más grandes, dispuestos en forma columnar. La división celular es, al igual que en la zona anterior, responsable del crecimiento de la placa, si bien en esta área, algunos de los condrocitos experimentan cambios degenerativos asociados con depósitos de calcio.
- La zona de cartílago calcificado, que consiste en un área de tan sólo algunas células de espesor, en la que las células han muerto o están próximas a morir por apoptosis. A medida que la calcificación progresa, esta área se vuelve frágil, siendo invadida por osteoblastos y capilares, produciendo una capa calcificada sólida entre la placa epifisiaria y la diáfisis.

Es claro que el cartílago articular no es sustituido por hueso y por lo tanto no presenta estas distintas zonas.

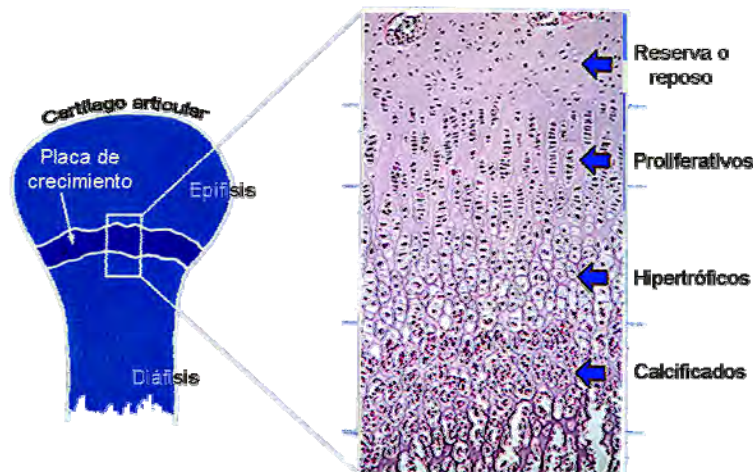


Figura 1. Se esquematizan las partes que conforman el hueso largo, ubicando la placa de crecimiento y las distintas fases de diferenciación de los condrocitos que la componen.

1.3. Cartílago articular y condrocitos

Una articulación sinovial o diartroïdal está compuesta de las epífisis de dos huesos adyacentes, de formas congruentes y recubiertas sucesivamente por hueso subcondral y cartílago articular (Fig. 2A). Las epífisis se mantienen en contacto por una cápsula articular reforzada por ligamentos. La membrana sinovial recubre la pared interna de la cápsula y delimita la cavidad articular conteniendo el líquido sinovial (Genevois, 1992). El cartílago articular es del tipo hialino, un tejido blanco-azulado, liso, brillante, y flexible pero firme. En el humano, su espesor varía desde algunas centenas de micras hasta 2 ó 3 milímetros (Trippel y Mankin, 1993), y conforma aproximadamente el 10% de la masa total cartilaginosa del cuerpo (Manicourt *et al*, 1999). Las funciones de este cartílago son diversas: permite la función articular a través de absorber la presión mecánica, evita la fricción y permite el movimiento.

El cartílago también participa en la reparación de fracturas. Se trata de un tejido conjuntivo diferenciado, que no contiene nervios ni vasos sanguíneos o linfáticos, y está firmemente unido al hueso subcondral (Loneux y Balligand, 1999). Como el cartílago es avascular, la nutrición de sus células depende de la difusión de nutrientes a través del líquido sinovial que lo baña.

El cartílago está constituido por un solo tipo celular, los condrocitos. Estas células son responsables de formar y recambiar la matriz extracelular del cartílago, compuesta principalmente de agua, colágena tipo II que asegura la resistencia del cartílago, y proteoglicanos los cuales determinan la elasticidad del tejido (Verset, 2005). Los condrocitos son relativamente escasos en el cartílago adulto, representando menos del 5% del peso seco del cartílago, y como se mencionó anteriormente, se derivan de células mesenquimatosas, los condroblastos (Johnston, 1997). Es muy raro observar condrocitos en mitosis en el cartílago sano, ya que su ritmo de proliferación es muy lento (Verset, 2005). El papel de los condrocitos es el de mantener la integridad del cartílago articular llevando a cabo procesos tanto catabólicos como anabólicos por medio de la secreción de diversos mediadores. Existen factores catabólicos como las citocinas pro-inflamatorias [la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)] y factores anabólicos [el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β)] (Hedbom y Häuselmann, 2002). La degradación del cartílago ocurre como consecuencia de la pérdida del balance entre estos factores.

1.4. Degradación del cartílago

La degradación del cartílago se acompaña de la sustitución por hueso durante la osificación endocondral, en donde el cartílago hipertrófico de la placa de crecimiento es invadido por vasos sanguíneos, seguido de la muerte de los condrocitos mediante el proceso de apoptosis. Este cuadro es explicado por el hecho de que los condrocitos se diferencian hacia células hipertróficas dejando de producir factores inhibidores de la angiogénesis y produciendo factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Descalzi Cancedda *et al.*, 1995; Gerber *et al.*, 1999). Sin embargo, el cartílago articular no sufre este proceso, y en cambio su degradación se asocia con la artritis. Se sabe que los condrocitos procedentes de cartílagos artríticos tienen características morfológicas de apoptosis (Blanco *et al.*, 1998).

La artritis o inflamación de la articulación, define a varios padecimientos entre los que sobresalen la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA). Ambos trastornos se caracterizan por la destrucción del cartílago y del hueso articular y, si bien difieren en su patogenia, los dos

son de alto impacto en la población mundial (1% de incidencia). La AR afecta a un gran número de personas (10 millones sólo en México), en su mayor parte mujeres (75%), y suele aparecer entre los 20 y los 45 años de edad (Cardiel, 2006). Por su parte, la OA es una forma de artritis muy común (5 millones de personas en México), su frecuencia aumenta con la edad y es la mayor causa de incapacidad física en hombres y mujeres mayores de 65 años. La AR es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de múltiples articulaciones. Esta inflamación es la responsable del dolor, del aumento del volumen articular que con frecuencia se observa y de la sensación de rigidez. En el curso de este padecimiento, la infiltración de células inmunocompetentes hacia la cavidad articular y la proliferación de la membrana sinovial generan una masa de tejido inflamatorio (panus) que, mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas, es capaz de invadir y destruir al cartílago y eventualmente al hueso (Fig. 2B). El lugar del cartílago en el que se fija dicho panus se daña, generando pequeñas erosiones, y al haber una inflamación crónica, el cartílago se adelgaza y desaparece (Justen *et al.*, 2000). La OA por su parte, es un proceso degenerativo en el cual la estimulación mecánica a consecuencia del sobreuso y abuso de la articulación promueve la destrucción y osificación del cartílago que conlleva a la pérdida progresiva de este tejido (Fig. 2C), interfiriendo con su funcionamiento normal al producir dolor e inmovilidad (Kerin *et al.*, 2002). La destrucción del cartílago que ocurre en la AR y en la OA se ha relacionado con inflamación del tejido sinovial y la apoptosis de los condrocitos (Karouzakis *et al.*, 2006; Kühn *et al.*, 2004; Yatsugi *et al.*, 2000).



Figura 2. Se esquematizan los cambios en la articulación que conducen a la destrucción del cartílago en las dos artropatías más importantes. a) Articulación normal, b) artritis reumatoide, donde el panus es capaz de invadir y destruir el cartílago articular mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas, y c) osteoartritis, donde el sobre uso y mal uso de la articulación conduce a cambios degenerativos y a la desaparición del cartílago articular.

1.5. Apoptosis de condrocitos e inflamación

Diversas evidencias apoyan la participación de la apoptosis en las enfermedades del cartílago articular. Por ejemplo, en la AR están presentes mecanismos tanto anabólicos como catabólicos responsables de inducir la degradación del cartílago a través de estimular la apoptosis de los condrocitos. Lo anterior se ha evaluado mediante métodos específicos como la tinción de anexina V (Alfaro *et al.*, 2000), el análisis del potencial de membrana mitocondrial y la determinación de la fragmentación del ADN por TUNEL, ELISA y citometría de flujo (Monfort *et al.*, 2006). En la OA la degradación y erosión del cartílago están mediadas por la liberación de factores catabólicos entre los que se pueden incluir a las citocinas pro-inflamatorias vía su efecto sobre la síntesis de proteasas, la reducción de procesos anabólicos de reparación y el decremento de la síntesis de componentes de la matriz extracelular como la colágena tipo II y el agregano. La consecuencia pro-apoptótica de estas alteraciones se ha detectado histológicamente (TUNEL, inmunohistoquímica para proteínas reguladoras, i.e., proteína de membrana mitocondrial asociada a células B de leucemia 2 (Bcl-2), proteína X asociada a Bcl-2 (Bax) y CD95 (Fas)), y mediante el análisis electroforético del ADN (Mistry *et al.*, 2004), pero aún no son claros los mecanismos involucrados en estas respuestas. Notablemente, la expresión del gen pro-apoptótico p53 en condrocitos, se ha correlacionado directamente con la degradación del cartílago en pacientes con AR y OA (Yatsugi *et al.*, 2000).

Las citocinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , el interferón- γ (INF- γ) y el TNF- α , han sido directamente implicadas en la destrucción del cartílago durante la AR y la OA (Ogueta *et al.*, 2002; Hedbom y Häuselmann, 2002). El TNF- γ y la IL-1 β son particularmente importantes en la fisiopatología de enfermedades del cartílago. Son indirectamente responsables de la degradación del cartílago y la muerte de los condrocitos y pueden estimular la producción de mediadores inflamatorios como IL-8, IL-6 y el factor inhibidor de leucocitos, proteasas y prostaglandina E2. Por otro lado, el TNF- α estimula la destrucción de la matriz extracelular y la inflamación sinovial, y su receptor ha sido localizado en células de zonas focalizadas de cartílago osteoartrítico donde ha habido pérdida de proteoglicanos (López-Armada *et al.*, 2006). Estudios en modelos animales de OA han demostrado efectos condroprotectores de terapias anti-citocinas (Goldring, 2001). En la mayoría de las enfermedades articulares humanas, la muerte de los condrocitos y la consecuente reducción en el número de células del tejido pueden

representar un paso importante en la patogénesis de la destrucción del cartílago (Blanco y Fernández-Sueiro, 1998). De manera interesante, un estudio reciente reportó que la apoptosis de los condrocitos podría ser una causa primaria y no una consecuencia de la degradación de la matriz cartilaginosa al ser invadida por el tejido inflamatorio durante la artritis, abriéndose la posibilidad de que factores solubles tales como el TNF- α sean los iniciadores de la cascada apoptótica en los condrocitos (Polzer *et al.*, 2007). Por lo tanto, sería lógico pensar que al inhibir la apoptosis inducida por citocinas pro-inflamatorias se pudiese prevenir la degradación del cartílago. Por este motivo decidimos generar un modelo animal en el que se indujera la muerte de los condrocitos por una combinación de citocinas pro-inflamatorias que nos permitiera estudiar la participación de la PRL como factor condroprotector.

1.6. PRL, receptor de PRL y vías de señalización

La PRL es una hormona peptídica secretada por la hipófisis anterior cuyo nombre se deriva de su acción sobre la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, esta proteína ejerce una multiplicidad de efectos que se ubican en la esfera de la osmorregulación, y de la regulación de las funciones reproductoras, del crecimiento corporal, respuestas inmunes y angiogénesis (Bole Feysot *et al.*, 1998; Corbacho *et al.* 2002). Esta diversidad funcional parece depender de la producción de la PRL por distintos tipos celulares, de la heterogeneidad molecular de sus receptores que le permiten acoplarse a diversas vías de señalización, así como de la modificación de la hormona hacia variantes moleculares con diferentes actividades biológicas (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

La PRL 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 aproximadamente 200 aminoácidos, con una masa molecular de 23 kDa (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Bole-Feysot *et al.*, 1998). Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales del tipo de la fosforilación, la glicosilación y la proteólisis (Sinha, 1995), que le confieren propiedades biológicas diversas. Por ejemplo, la fosforilación puede generar antagonistas de la hormona (Wang y Walker, 1993), mientras que la

glicosilación (Hoffman *et al.*, 1993) y la proteólisis (Anthony y Powers, 1993; Clapp *et al.*, 1989) se traducen en variantes de la PRL con una menor actividad hormonal mitogénica y lactogénica.

Con respecto al receptor de la PRL (RPRL), se han identificado al menos tres isoformas que resultan del procesamiento alternativo del ARN mensajero (Boutin *et al.*, 1988; Davis y Linzer, 1989). El dominio de unión al ligando es idéntico en todas las isoformas y la diferencia entre los receptores reside en la extensión del dominio intra-citoplásmico que los define como corto (42 kDa), intermedio (65 kDa) y largo (85 kDa). El RPRL 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 RPRL es muy bajo y se desconoce si un aumento en su expresión pudiese ser un factor determinante para su función. (Nagano y Kelly, 1994).

El RPRL es activado por la PRL y el lactógeno placentario de las diferentes especies y también por la hormona de crecimiento pero 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 RPRL carece de actividad enzimática intrínseca, por lo que 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 más importante activada por el RPRL es la vía JAK/STAT (de sus siglas en inglés, “Janus kinases”/ “signal transducer and activator of transcription”). La dimerización del RPRL induce la transfosforilación/activación de las cinasas de tirosina JAK2 que se encuentran normalmente en la vecindad de cada molécula del receptor. Las JAK2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del propio receptor, lo que a su vez origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son también fosforiladas por las JAK2. Una vez fosforiladas, las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que se translocan al núcleo, uniéndose a secuencias consenso en el ADN denominadas GAS (interferon- γ activation sequence) y activando la transcripción génica (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Las proteínas STAT activadas por la PRL incluyen tres: la STAT-1 que en respuesta a la PRL estimula la transcripción del gen de IRF-1 (“interferon regulatory factor-1”) en células hematopoiéticas; la STAT-3 que es activada en

respuesta a la PRL y que se sabe induce la expresión del Bcl-2 en células B y la activación de Akt en las neuronas (Levy y Lee, 2002); y la STAT-5, que en el epitelio mamario induce la expresión de genes de β -caseína y β -lactoglobulina, entre otros (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).

1.7. PRL como molécula anti-apoptótica

Se sabe que la PRL es un factor inhibidor de la apoptosis en células de diversos tejidos como el epitelio mamario, la próstata, la granulosa, la decidua, así como células de carcinoma ovárico, y linfocitos (Ploszaj *et al.*, 1998; Buckley, 2001; Tessier *et al.*, 2001; Ruffion *et al.*, 2003; Perks *et al.*, 2003; Asai-Sato *et al.*, 2005).

La acción anti-apoptótica de la PRL ha sido asociada con un incremento de Bcl-2 y un decremento de Bax en células en cultivo del epitelio mamario de ratón (Ploszaj *et al.*, 1998) y en una línea celular de cáncer de mama (Peirce y Chen, 2004).

Experimentos realizados por Tessier y colaboradores ponen de manifiesto que la PRL puede actuar inhibiendo la apoptosis en la decidua de rata y que dicho efecto es mediado por la forma larga del RPRL, inhibiendo la activación de la caspasa 3 al activar la vía de señalización PI3K/Akt (Tessier *et al.*, 2001). En células de cáncer de próstata, también se reportó la acción anti-apoptótica de la PRL vía la fosforilación de Akt (Ruffion *et al.*, 2003).

1.8. Modelo de hiperprolactinemia

Típicamente, el estudio de la función de un mensajero químico implica la observación de los efectos inducidos por su administración, así como de las consecuencias de suprimir su producción o su acción. Así, para estudiar el efecto anti-apoptótico *in vivo* de la PRL utilizamos en la rata dos modelos: la administración intra-articular de la PRL exógena, y la inducción de

hiperprolactinemia mediante el implante de dos adenohipófisis bajo la cápsula renal (Fiore *et al.*, 1984).

Los lactotropos, las células hipofisarias productoras de la PRL, están sometidos a un control hipotalámico fundamentalmente inhibitorio, ejercido en buena parte por la dopamina vertida al sistema circulatorio portal hipofisiario. Aparte del efecto inhibitorio de la dopamina, el ácido gamaminobutírico (GABA) también actúa directamente sobre los lactotropos a través de receptores específicos, aunque el efecto inhibidor se estima que es unas 100 veces menos efectivo que el de la dopamina (Pérez-López y Robyn, 1974). Al transplantar adenohipófisis a sitios alejados del control dopaminérgico hipotalámico, los lactotropos sobrevivientes incrementan la secreción de PRL. Este es el fundamento del modelo de hiperprolactinemia inducida por el implante de adenohipófisis bajo la cápsula renal. Se ha reportado que ratas macho hiperprolactinémicas muestran un retraso en el inicio y una reducción en la severidad de la artritis inducida por adyuvante completo de Freund (Neidhart y Flückiger, 1992). Cabe mencionar también que al aumentar los niveles de la PRL en ratas gestantes, se ocasiona una reducción en la formación del hueso en las crías, las cuales muestran evidencia de hiperplasia del cartílago (Coss *et al.*, 2000).

Es importante señalar que la interrupción de la expresión del gen del RPRL reduce el desarrollo y el crecimiento del hueso (Clément-Lacroix *et al.*, 1999), eventos dependientes de la osificación endocondral en la cual es necesario un fino balance entre la proliferación y la apoptosis de los condrocitos de la placa de crecimiento.

Lo anterior sugiere la posibilidad de que la PRL tenga acciones sobre los condrocitos del cartílago, aunque no aporta evidencias de un efecto directo sobre el cartílago articular específicamente. No obstante, la presencia de PRL en la articulación sinovial ya ha sido reportada (Ogueta *et al.*, 2002).

1.9. PRL en la articulación sinovial

Diversas evidencias han asociado a la PRL con la funcionalidad del cartílago. Por ejemplo, se ha sugerido su participación en el desarrollo del cartílago ya que el receptor de la PRL se expresa en el cartílago murino, humano y de rata durante la gestación (Tzeng y Linzer, 1997; Freemark *et al.*, 1997; Coss *et al.*, 2000). Además, la PRL se expresa en células madre derivadas de la médula ósea, cuando se induce su diferenciación a condrocitos; y en estas condiciones, la PRL estimula la producción de la colágena II, de proteoglicanos y su propia expresión. Más aún, 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). Estos estudios se han realizado sobre condrocitos involucrados en la osificación endocondral en el cartílago de la placa de crecimiento. Sin embargo, hasta el momento no existen datos de las posibles acciones fisiológicas de la PRL sobre los condrocitos del cartílago latente que es el articular.

Por otra parte, la PRL se ha asociado también con procesos patológicos de la articulación. En pacientes con AR se han reportado niveles altos de PRL en el suero (Mateo *et al.*, 1998; Seriola *et al.*, 2002). También se ha encontrado que en el tejido sinovial de los pacientes con AR se expresa el ARN mensajero de la PRL (Nagafuchi *et al.*, 1999); que la PRL está presente en el líquido sinovial de pacientes con sinovitis y AR, y que el RPRL se expresa en el cartílago de pacientes con OA (Ogueta *et al.*, 2002). En estos padecimientos se ha asociado a la PRL con la hiperactividad del sistema inmune que los caracteriza, ya que se sabe que la PRL estimula las respuestas celular y humoral a través de acciones directas sobre distintos tipos de células inmunocompetentes (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Nosotros proponemos que la PRL actúa localmente sobre el cartílago articular contribuyendo a mantener su integridad, al proteger de la apoptosis a los condrocitos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los antecedentes mencionados, es clara la importancia de mantener la integridad del cartílago articular. Dado que la apoptosis de los condrocitos es un fenómeno inicial en patologías caracterizadas por la degradación del cartílago y que la PRL, que es un factor de sobrevivencia en diversos tipos celulares, se encuentra presente en el líquido sinovial, en este proyecto investigamos si la PRL y su receptor se expresan en el cartílago articular y si la interacción entre éstos puede inhibir la apoptosis de los condrocitos.

3. HIPÓTESIS

La PRL es un factor de sobrevivencia de los condrocitos que contribuye a mantener la integridad del cartílago articular.

4. OBJETIVOS

1. Estudiar la presencia de la PRL en el cartílago articular y si ésta es producida y secretada por los condrocitos.
2. Evaluar la posibilidad de que los condrocitos sean un blanco de acción de la PRL al investigar la presencia de su receptor.
3. Determinar el efecto anti-apoptótico de la PRL a través de evaluar si dicha proteína inhibe la apoptosis inducida por disminución del suero fetal bovino en cultivos de condrocitos.
4. Confirmar el efecto anti-apoptótico de la PRL en modelos de apoptosis inducida *in vivo* por la administración de citocinas pro-inflamatorias.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Prolactina, anticuerpos y citocinas. La PRL de rata y el anticuerpo policlonal anti-PRL IC-5 fueron adquiridos del Programa Nacional de Hormonas y Péptidos de los Institutos Nacionales de la Salud de EUA (NHPP, Torrance, CA, EUA). Los anticuerpos anti-prolactina policlonales (C-1) y monoclonales (INN-368 e INN-1) fueron generados y caracterizados previamente (Aranda *et al.*, 2005). Los anticuerpos monoclonales anti-RPRL (U5 y U6) dirigidos contra la región extracelular del receptor, fueron donados por el Dr. Paul Kelly (INSERM U-584, Francia). Las citocinas pro-inflamatorias recombinantes de humano (IL-1- β , TNF- α e IFN- γ) se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). La bromocriptina es un medicamento comercial (Parlodel®, Novartis Farmacéutica).

5.2. Procesamiento histológico de la articulación. Se utilizó el método previamente descrito para procesar la articulación en parafina (Bancroft *et al.*, 1996). Brevemente, los animales se sacrificaron 48 h después de la inyección intra-articular de los tratamientos correspondientes, se disecaron las rodillas y se fijaron en formalina al 10% a temperatura ambiente (T_{amb}) por 2 días. Posteriormente, las rodillas se descalcificaron mediante incubación en EDTA al 14% a 37°C durante 7 días, y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol (60, 70, 80, 96 y 100%). Finalmente, las articulaciones se incluyeron en parafina. Para las evaluaciones histológicas (presencia de la PRL y su receptor, TUNEL y DAPI) los cortes histológicos de 10, 8 ó 5 micras de espesor fueron desparafinados y rehidratados bajo concentraciones decrecientes de alcohol (100, 96 y 80%).

5.3. Inmunofluorescencia para PRL en la articulación. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-PRL (IC-5) y monoclonales (INN-1) para marcar cortes de 10 micras de las rodillas de ratas normales, incluidas en parafina. Brevemente, se bloquearon los sitios inespecíficos del tejido con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS-Tween 0.05% durante 2 h a T_{amb} . Después de lavar con PBS, se dejó el tejido en contacto con el anticuerpo primario (IC-5 1:500 e INN-1 1:100) durante toda la noche a T_{amb} . Después, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS y marcadas por 2 h a T_{amb} con anticuerpos secundarios Alexa-

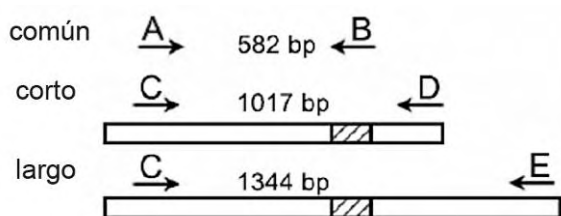
594 anti-conejo (1:2000) ó Alexa-488 anti-ratón (1:1000) de cabra y obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR, EUA), se lavaron y se cubrieron con PBS-glicerol y cubreobjetos.

5.4. Aislamiento y cultivo de condrocitos. El cartílago se obtuvo de la superficie de los platos tibiales y de los cóndilos femorales de ratas Wistar machos de 120-150 g. El cartílago se cortó en pequeños fragmentos y se digirió con tripsina (Research Organics, Cleveland, OH, EUA) al 0.03% durante 10 min en agitación a T_{amb} , para posteriormente incubarse con colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) al 0.03% en agitación a 37°C durante 2 h. Los agregados celulares residuales se aislaron por sedimentación, se filtraron a través de una malla de nylon y se lavaron con 0.9% NaCl, 1 mM EGTA. Después de verificar la viabilidad de las células y contarlas, se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/cm² con medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA), y se cultivaron a 37°C bajo una atmósfera de 95% aire/ 5% de CO₂ para permitirles recuperarse y adherirse al plato durante una noche. Posteriormente fueron tratados según las necesidades del experimento a realizar.

5.5. Inmunoprecipitación-Western blot. Para evaluar la expresión de la PRL, los condrocitos recién aislados fueron homogenizados en buffer de lisis (50 mM NaCl, 150 mM Tris, 0.1% SDS, 1% Igepal, 0.45 µl/ml aprotinina y 0.170 mg/ml de fenilmetilsulfonil fluoruro) durante 15 min en hielo. Para la obtención de medios condicionados, se utilizaron cultivos primarios de condrocitos de 24 h con 10 ó 0.5% de SFB, después se colectaron los medios y se centrifugaron a 1,200 X G durante 5 minutos para descartar los sedimentos celulares; los sobrenadantes se concentraron 5 veces (Centricon 3: Amicon Millipore, Billerica, MA, EUA) y se congelaron a -70°C. Posteriormente, tanto a los homogenados de condrocitos como a los medios condicionados se les agregó buffer Laemli, se centrifugaron (a 3800 G) y el sobrenadante se hizo migrar en SDS-PAGE al 15%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la inmunotinción contra PRL se hizo usando anticuerpos policlonales (C-1, 1:1000) y monoclonales (368, 1:500 e INN-1, 1:1000). Se usaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., PA, EUA) diluídos 1:20000 para finalmente revelar la tinción por quimioluminiscencia. Para evaluar la expresión del RPRL, los extractos de condrocitos recién aislados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-RPRL (U5, 5 µg) usando la técnica previamente descrita (Corbacho *et al.*,

2000). Los precipitados se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 8%, seguido de la transferencia a membranas de nitrocelulosa e incubación con anti-RPRL (U5, 1:500), y finalmente el revelado con el kit de anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5.6. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ARN total de los condrocitos del cartílago articular de rodillas de ratas normales fue extraído usando el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN total (5 µg) fue retrotranscrito utilizando la enzima retrotranscriptasa M-MLV [Moloney murine leukemia virus] (Promega, Madison, WI, EUA) y oligo (dT 16) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Para la amplificación de la PRL se utilizaron dos iniciadores complementarios al ADNc de la PRL humana: sentido 5'-GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA-3' y antisentido 5'-GCAGTTGTTGTTGTGGATGA TT-3'. Para la retrotranscripción de las diversas isoformas del RPRL se utilizaron iniciadores específicos con la siguiente secuencia sentido: (A) CCC



CAA CTC CTG CTT CTT TAG, y antisentido (B) TAT TTT TGG CCC AGG AAC TA; o específicos para la isoforma corta sentido: (C) ATC CTG GGA CAG ATG GAG GAC, y antisentido (D) TGG CTG AGG CTG ACA

AAA GAG; o para la isoforma larga el sentido C y el antisentido (E) AGA CAG TGG GGC TTT TCT CCT. Para la amplificación de la secuencia de la colágena tipo II se usaron los iniciadores de secuencia específica: sentido CAA GGG AGA CAG AGG TGA TGT, y antisentido TCT GTC CAG CTT CTC CTT GAT, que generan un producto de 287 pb. Para las amplificaciones anteriores se empleó un equipo Perkin Elmer (Gene Amp, PCR System 2400) y los productos fueron confirmados por autorradiografía.

5.7. Inmunohistoquímica para el receptor de la prolactina. Se obtuvieron cortes de 8 micras de las rodillas de ratas intactas embebidas en parafina. Los cortes se incubaron con H₂O₂ al 1% por 15 min a T_{amb} para eliminar la actividad de peroxidasas presentes en el tejido. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues de 5 min con PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con PBS-Tritón 0.3% adicionado con suero normal de cabra (NGS) al 1% y BSA al 2%. Se enjuagaron nuevamente y se incubaron con la solución del primer anticuerpo

monoclonal de ratón anti-RPRL (U5 ó U6), a una dilución de 1:100 en PBS-tritón 0.05%-BSA 1%. Se volvieron a realizar enjuagues con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a biotina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories Inc., CA, EUA) a T_{amb} durante una hora. Posteriormente se incubaron con un complejo de avidina-peroxidasa biotinilada (ABC) por media hora más y se enjuagaron en PBS. El revelado se realizó con 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB) del kit (Vector SK 41000).

5.8. Evaluación de apoptosis *in vitro*. Se utilizó el estuche de ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los condrocitos se sembraron a una densidad de 200,000/pozo (caja de 48 pozos), se incubaron por 48 h en DMEM con 10 ó 0.5% SFB o bien por 24 h en DMEM con 10% SFB en presencia o ausencia de *citomix* con o sin PRL (100 nM). **Ensayo de ELISA.** Se cuantificó el ADN nucleosomal fragmentado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, en una caja de ELISA se pusieron 50 μ l/pozo de solución de cubrimiento (anti-histona, anticuerpo que reconoce a las histonas que quedan libres debido a la degradación del ADN) y se incubó por 1h a T_{amb} . Se retiró la solución y en su lugar se pusieron 100 μ l/pozo de buffer de incubación, y se incubaron por 30 min a T_{amb} . Posteriormente se pusieron 50 μ l de la muestra por pozo (dilución 1:10) y se incubaron durante 90 min a T_{amb} . Se lavó y se agregaron 50 μ l de anti-ADN/pozo, por 90 min a T_{amb} , se lavó de nuevo y se pusieron 50 μ l de sustrato/pozo incubándose en agitación a 250 rpm, hasta ver el color (15 min), se homogenizaron golpeando suavemente y se leyó a 405 nm y 490 nm contra la solución del sustrato.

5.9. Inyecciones intra-articulares. Las ratas Lewis (implantadas o intactas) fueron inyectadas en la cavidad sinovial con un volumen final de 60 μ l de *citomix* conteniendo TNF- α (5 ng/ml), IL-1- β (100 U/ml) e IFN- γ (25 ng/ml). Se realizó otro grupo co-inyectando PRL (8 μ g) con el *citomix* en la articulación. Como vehículo se utilizó agua libre de endotoxinas.

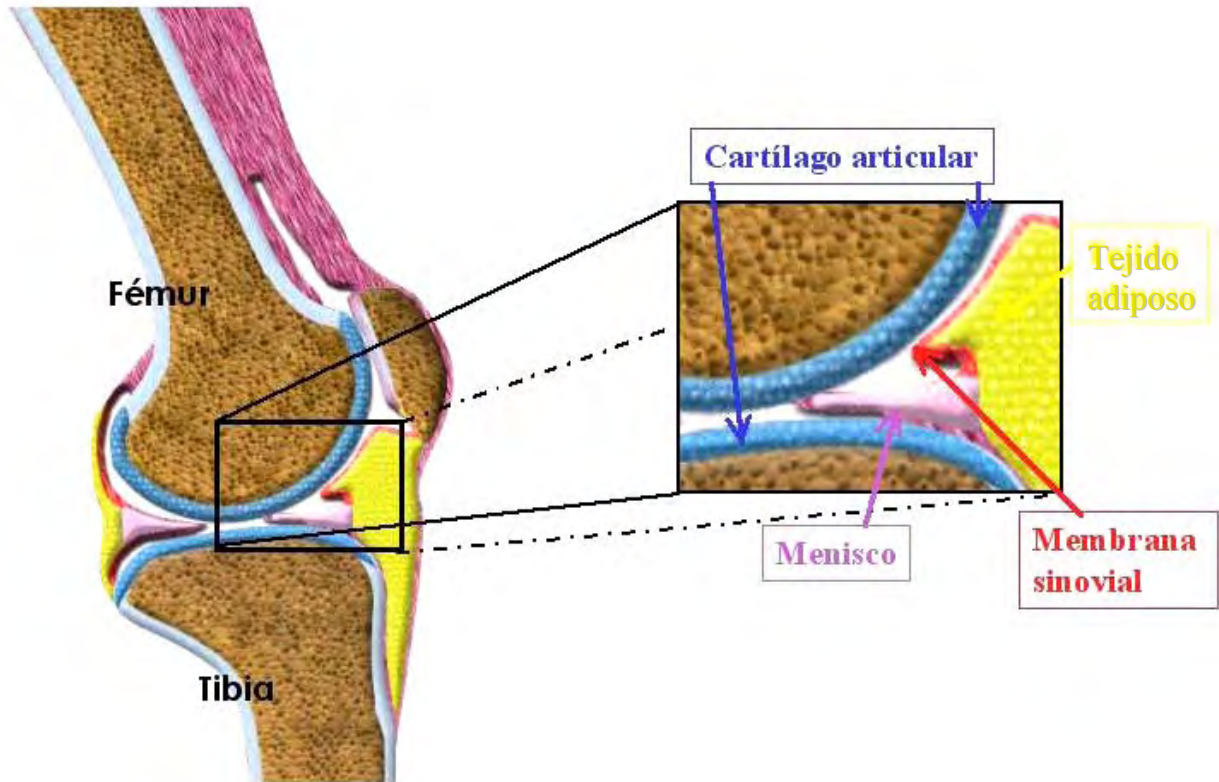
5.10. Inducción de hiperprolactinemia. Con el auxilio del Dr. Andrés Quintanar de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se transplantaron dos adenohipófisis de ratas hembra de la misma camada, bajo la cápsula renal de ratas macho de la cepa Lewis (Fiore *et al.*, 1984). A los 15 días post-operación, cuando se alcanza el nivel máximo de PRL en la

circulación sanguínea (Moro *et al.*, 2001), los animales fueron sacrificados y su suero recuperado para medir los niveles de PRL circulante mediante ELISA.

5.11. ELISA para cuantificar PRL en la circulación. Cada pozo de la placa de ELISA se forró con 10 ng de estándar de PRL de rata y por otro lado se prepararon las muestras problema y las muestras con concentración conocida. Se dejaron incubando a 4°C toda la noche con un anticuerpo policlonal anti-PRL de rata (C-1). Al día siguiente se lavó la placa y se bloquearon los sitios inespecíficos durante 1 h a T_{amb}. Después se lavó nuevamente y se pusieron las muestras a incubar en la placa durante 2 h a T_{amb}. Se volvió a lavar y se incubó con anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa diluido (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., PA, EUA) 1:1000 en solución bloqueadora y por 30 min a T_{amb}. Finalmente se reveló con ortofenilendiamina y se leyó a 490 nm. Utilizando una regresión de absorbancia obtenida con las muestras de concentración conocida, se obtiene la concentración final de PRL en las muestras problema

5.12. Evaluación de la apoptosis *in situ*. La determinación de la apoptosis *in situ* se hizo utilizando la técnica de TUNEL, que consiste en detectar células apoptóticas mediante la acción de la deoxinucleotidiltransferasa que une nucleótidos marcados con fluorescencia (UTPs) a los OH de los extremos 3' del ADN fragmentado. Seguimos el método previamente empleado por nosotros (Dueñas *et al.*, 2004). También se realizó tinción nuclear por DAPI para reconocer en el núcleo el ADN condensado y/o fragmentado.

5.13. Análisis de imágenes. Los cortes de tejidos marcados para proteínas o apoptosis, se observaron al microscopio con ampliaciones de 4, 10, 20, 40, 60 y/o 100X y las imágenes fueron capturadas en el programa Image Pro-Plus® para posteriormente ser analizadas y cuantificar la intensidad de la marca positiva de TUNEL con el Line Profile®, usando como modelo el siguiente esquema:



5.14 Análisis estadístico. Todos los experimentos se realizaron al menos en tres ocasiones independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba T de Student no pareada en donde un valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 La PRL se encuentra en el cartílago y es producida y secretada por los condrocitos

En primer lugar demostramos que la PRL está presente en el cartílago articular y que es producida y secretada por los condrocitos. La figura 3, muestra secciones de articulaciones femoro-tibiales de rata procesadas en parafina y teñidas por inmunofluorescencia con INN-1 (Fig. 3A) e IC-5 (Fig. 3B) anti-PRL. Ambos anticuerpos marcaron positivamente a los condrocitos del cartílago articular. También se observó marca positiva en el tejido óseo. Sin embargo, en apoyo a la especificidad de la marca en los condrocitos, no se observó reacción positiva en el cartílago, pero si en el hueso, en ausencia de los anticuerpos primarios (resultados no mostrados). Estos hallazgos apoyan la presencia de PRL en los condrocitos.

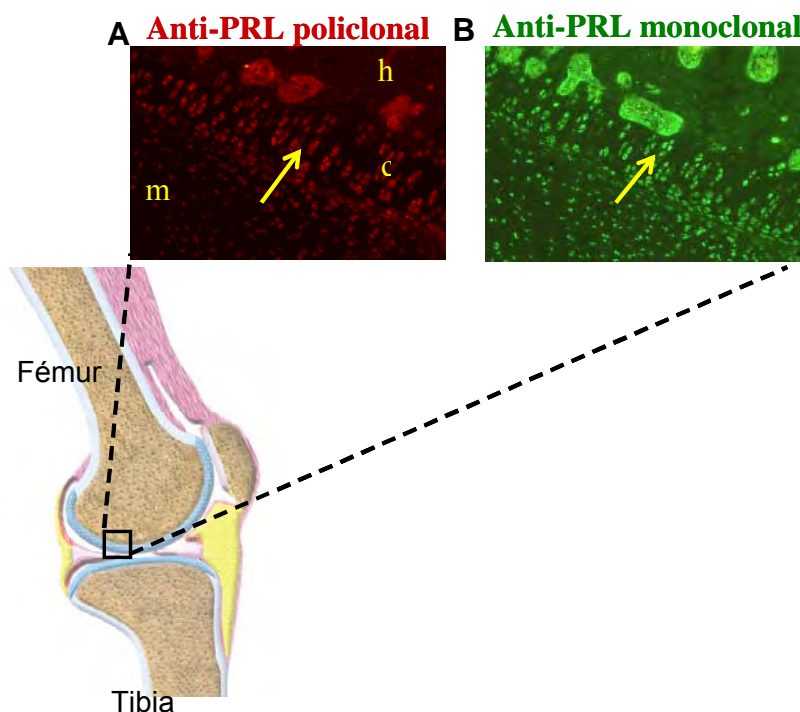


Figura 3. Detección de PRL mediante la inmunofluorescencia de secciones de la articulación femoro-tibial procesadas en parafina y reveladas con anticuerpos anti-PRL A) policlonaes (IC-5-rodamina) y B) monoclonales (INN1-fluoresceína). Las flechas amarillas indican la señal positiva en el cartílago articular. Magnificación 20x. El esquema ilustra el lugar de la articulación donde se tomó la fotografía con el fin de ubicar las partes que se observan: hueso (h), cartílago (c) y menisco (m).

Para evaluar si la PRL es sintetizada por el propio condrocito, evaluamos la expresión del ARN mensajero de la PRL en condrocitos aislados del cartílago articular. El análisis por RT-PCR muestra un producto de amplificación de mismo tamaño que el obtenido a partir del ADN complementario (ADNc) de la PRL y por lo tanto podría corresponder al ARN mensajero de la PRL (Fig. 4A). Además, no se observaron productos de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa. El ARN mensajero de la PRL se traduce a proteína como lo sugiere la presencia de PRLs inmunorreactivas de 23 y 16 kDa detectadas mediante Western blots en extractos de los condrocitos aislados (Fig. 4B). La PRL de 23 kDa probablemente corresponde a la forma predominante de la PRL o PRL nativa, mientras que la PRL de 16 kDa parece corresponder a una de las vasoinhibinas. Así, la PRL de 23 kDa fue detectada por anticuerpos anti-PRL policlonales y por dos anticuerpos monoclonales anti-PRL dirigidos uno contra el extremo amino-terminal y el otro contra la región carboxilo terminal de la hormona (Fig.4B). La PRL de 16 kDa fue reconocida por el anticuerpo policlonal y por el monoclonal dirigido contra el extremo amino-terminal pero no por el monoclonal que reconoce la región carboxilo-terminal de la PRL (Fig. 4B). Dado que las vasoinhibinas corresponden a fragmentos que contienen la región amino-terminal de la PRL (Clapp C *et al.*, 2006), estos hallazgos demuestran la presencia de vasoinhibinas en los condrocitos del cartílago articular. Además, sabemos que los condrocitos producen y secretan metaloproteasas de matriz que generan vasoinhibinas a partir de la PRL (Macotella *et al.*, 2006).

La expresión de la PRL y su procesamiento hacia vasoinhibinas por parte de los condrocitos apoya la relevancia funcional de estos péptidos para la fisiología del cartílago. Al respecto, era importante investigar si estas proteínas son secretadas por los condrocitos, y por ende pueden funcionar como reguladores locales en el cartílago. Así, mediante la inmunoprecipitación-Western blot de medios condicionados de los condrocitos en cultivo detectamos la presencia de vasoinhibinas. En apoyo a la especificidad del aislamiento, estas proteínas solamente se detectaron cuando se usaron anticuerpos anti-PRL en la inmunoprecipitación pero no cuando se usaron anticuerpos preinmunes de conejo (Fig. 4C). Dado que las vasoinhibinas inhiben la angiogénesis (Clapp *et al.*, 2006) y que el cartílago es un tejido avascular es posible proponer que estos péptidos contribuyen a mantener la ausencia

local de vasos sanguíneos. En estos experimentos no fue posible detectar a la PRL en los medios condicionados debido al artefacto ocasionado por las cadenas cortas de los anticuerpos que tienen una masa molecular (~25 kDa) cercana a la zona de la PRL. Estos hallazgos fueron publicados recientemente por nuestro grupo (Macotella *et al.*, 2006).

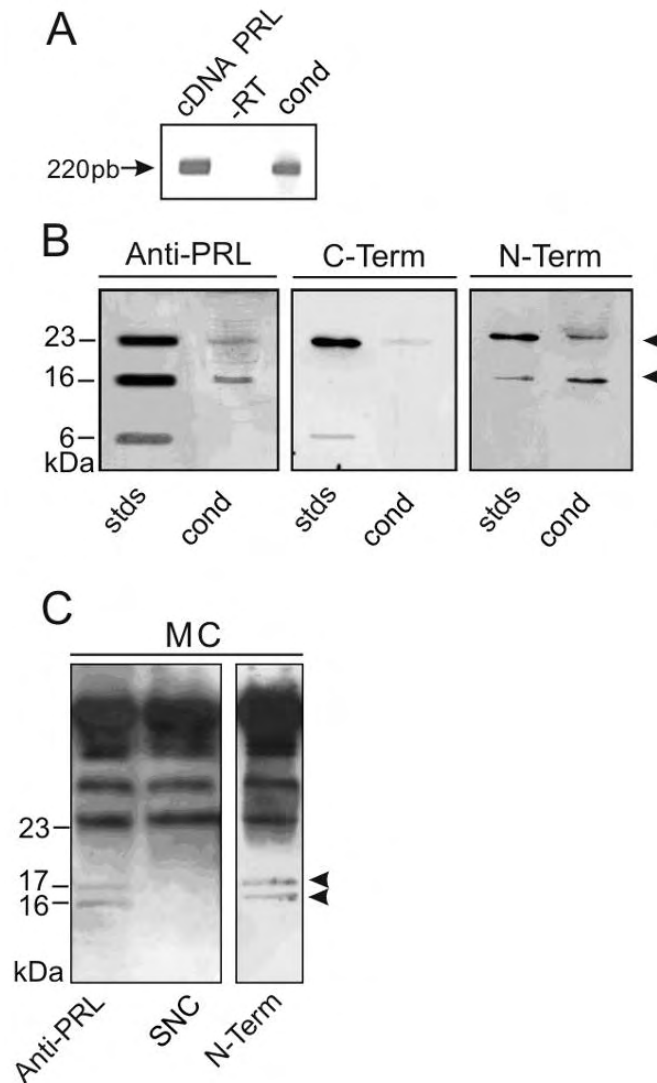


Figura 4. A) Productos de RT-PCR para PRL amplificados a partir del ADN complementario de PRL (cDNA PRL; control positivo) y el ARN total aislado de condrocitos (cond) en presencia o en ausencia (-RT; control negativo) de retrotranscriptasa. B) Prolactinas inmunorreactivas de 23, 16 y 6 kDa analizadas por Western blot en estándares (stds) y homogenados de condrocitos (cond) con anticuerpos anti-PRL policlonal (Anti-PRL) y monoclonales (C-term y N-term). C) Medios condicionados de condrocitos (MC) analizados por inmunoprecipitación-Western blot con anticuerpos anti-PRL policlonal (Anti-PRL) y monoclonal (N-term) o con suero normal de conejo (SNC).

6.2 Los condrocitos expresan la isoforma larga del receptor de la PRL

Para estudiar si la PRL puede actuar directamente en los condrocitos para regular su sobrevivencia, primero examinamos la expresión del RPRL en condrocitos articulares aislados de cartílago normal de rata. El ARN mensajero del RPRL fue investigado por RT-PCR (Fig. 5A). La amplificación utilizando iniciadores comunes para todas las isoformas del RPRL o específicos para la forma larga, generó transcritos con el tamaño esperado de 582 ó 1344 pb respectivamente (Fig. 5A, carriles 4 y 5). Estos productos fueron iguales en tamaño a los amplificados a partir del ADNc del RPRL (carriles 1 y 2). No se amplificó ningún producto en los condrocitos cuando se utilizaron iniciadores específicos para la isoforma corta del RPRL (carril 6). Para determinar si el ARN mensajero se traducía en la proteína, se inmunoprecipitaron lisados de condrocitos y se analizaron por inmunoblot (Fig. 5B). El anticuerpo monoclonal anti-RPRL U5 precipitó principalmente una proteína de ~85 kDa, el tamaño esperado para la forma larga del RPRL (Okamura *et al.*, 1989).

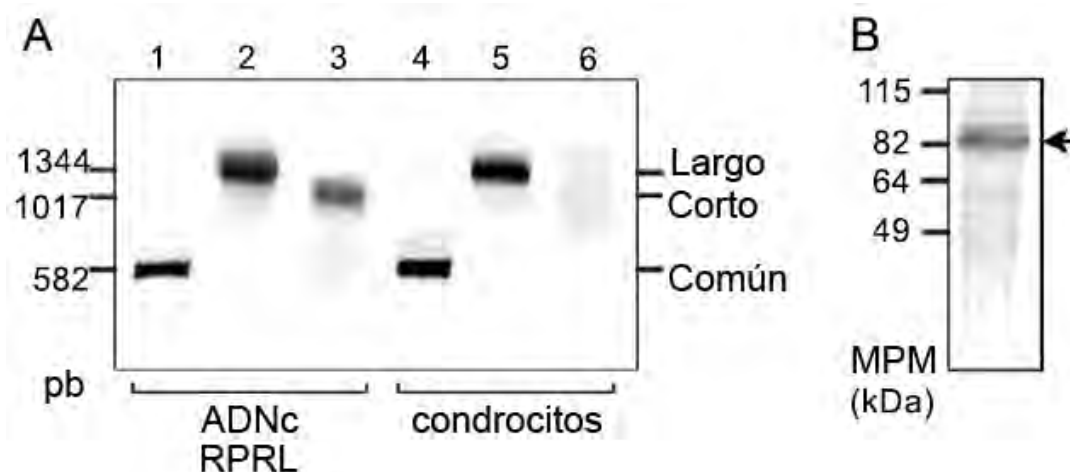


Figura 5. A) Productos de RT-PCR para el receptor de prolactina (RPRL) amplificados con iniciadores que reconocen todas las isoformas del RPRL. Amplificación a partir de ADNc del RPRL (control positivo) y del ARN total extraído de condrocitos, en presencia o en ausencia (-RT; control negativo) de retrotranscriptasa. B) Homogenado de 2 millones de condrocitos analizado por inmunoprecipitación-Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-RPRL-U5. Se detectaron proteínas inmunorreactivas que corresponden en peso a la isoforma larga (85 kDa) del receptor.

Además, la presencia del RPRL fue examinada por inmunohistoquímica en el cartílago articular de secciones de cabezas del hueso femoral de ratas adultas (Fig. 6). Los condrocitos del cartílago articular se marcaron positivamente para el RPRL con los anticuerpos

monoclonales anti-RPRL U5 y U6 (Fig. 6B, D) y no hubo señal positiva en ausencia de anticuerpos primarios (Fig. 6A) o con IgGs control (Fig. 6C).

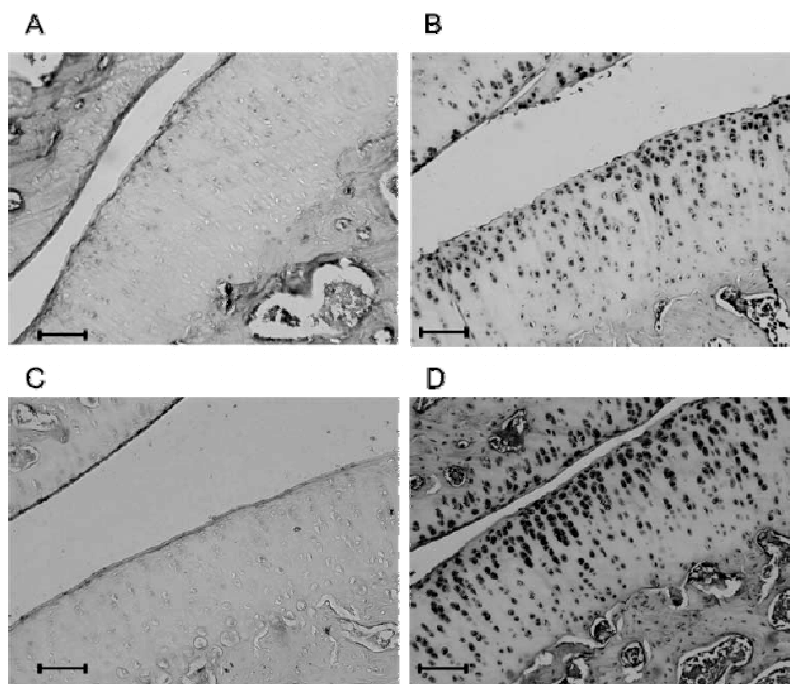


Figura 6. Detección por inmunohistoquímica del RPRL en cortes del cartílago epifisiario femoral de rata embebidos en parafina. Los anticuerpos monoclonales U5 y U6 marcaron positivamente a los condrocitos (B y D) y esta reacción fue específica a juzgar por la ausencia de marca cuando se omitieron estos anticuerpos primarios (A) o cuando se usaron IgGs control (C). La escala de la barra representa 100 μ m.

6.3 La PRL tiene acción anti-apoptótica sobre los condrocitos

Habiendo localizado tanto a la PRL como a su receptor en los condrocitos del cartílago articular, abordamos la pregunta sobre su posible función en dicho tejido. Con el antecedente de que la PRL tiene actividad anti-apoptótica en algunos tipos celulares como la línea Nb2 de linfocitos T, el epitelio mamario y el de la próstata (Ploszaj *et al.*, 1998; Buckley, 2001; Ruffion *et al.*, 2003), nos dimos a la tarea de estudiar si la PRL también inhibe la apoptosis inducida por la disminución de SFB en los cultivos de condrocitos (Feng *et al.*, 1998).

Inicialmente determinamos si los condrocitos cultivados con concentraciones altas (10%) o bajas (0.5%) de SFB mantienen sus características diferenciadas y por lo tanto son un buen modelo para analizar su regulación funcional. Para esto, determinamos por RT-PCR la

expresión de la colágena II, un marcador de condrocitos diferenciados, en condrocitos cultivados bajo las dos condiciones experimentales. En ambos tipos de cultivos amplificamos un producto que corresponde en tamaño al del ARN mensajero de la colágena II (Fig. 7). El producto de amplificación fue purificado, clonado y secuenciado y dio como resultado una secuencia idéntica a la reportada en la literatura para la colágena II. Esta molécula es específica de los condrocitos y no se expresa ni en eritrocitos ni en células óseas, que son los tipos celulares que podrían contaminar el aislamiento, con lo cual demostramos que los condrocitos en cultivo mantienen su estado diferenciado.

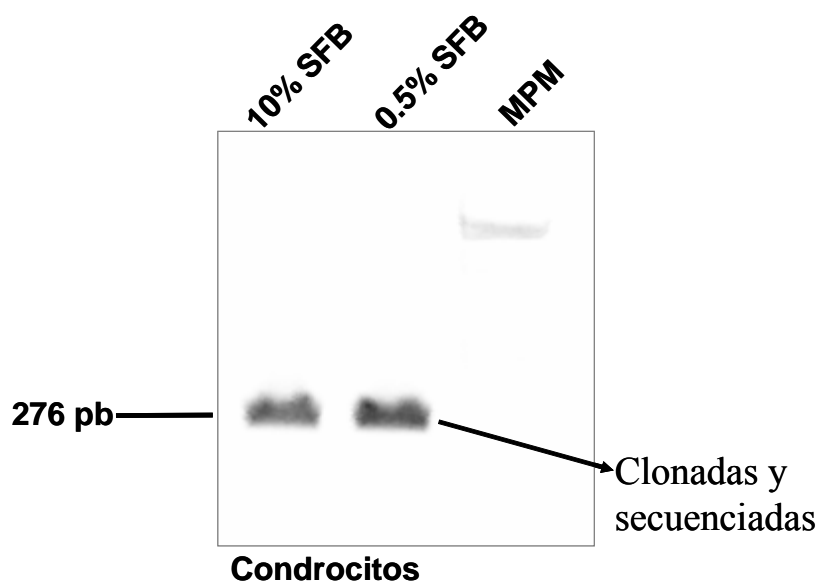


Figura 7. Productos de RT-PCR para colágena tipo II amplificados a partir del ARN total aislado de cultivos primarios de condrocitos en 10% ó 0.5% de SFB.

Posteriormente determinamos la presencia de apoptosis en condrocitos cultivados con concentraciones altas o bajas de SFB. Inicialmente evaluamos la muerte celular programada mediante la técnica de TUNEL, que detecta al ADN fragmentado característico de células en apoptosis. Encontramos que a dosis bajas de SFB en el medio de cultivo incrementa significativamente el número de células positivas (Fig. 8A). La co-incubación con 100 nM de PRL redujo la apoptosis a los niveles observados con 10% de SFB (Fig. 8A). Adicionalmente cuantificamos el nivel de apoptosis mediante la técnica de ELISA, que también evalúa la fragmentación de ADN. Observamos que el efecto anti-apoptótico de la PRL es dependiente de la dosis (Fig. 8B).

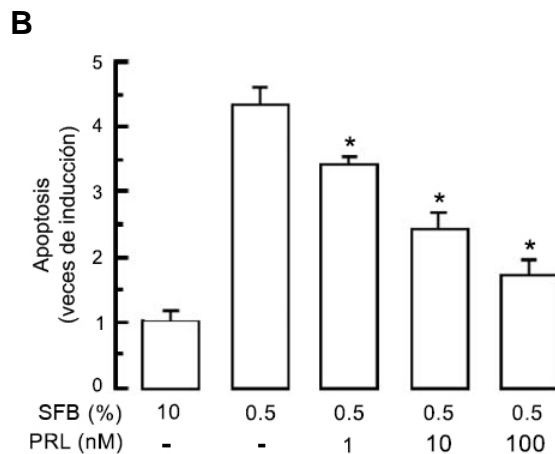
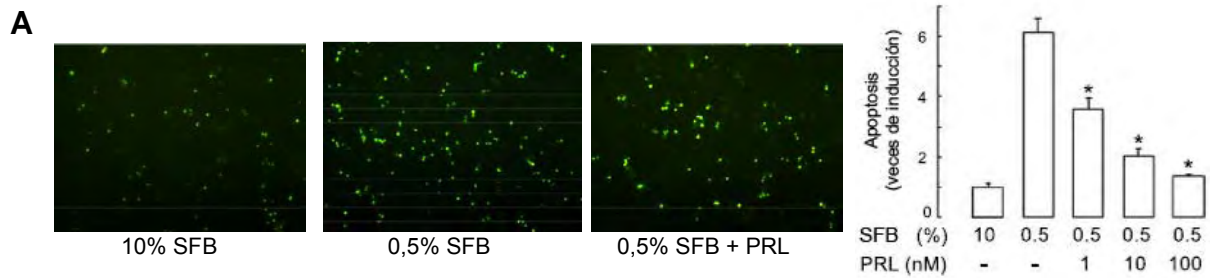


Figura 8. La PRL inhibe la apoptosis inducida por disminución del SFB el medio de cultivo de condrocitos. A) Microfotografías representativas de cultivos de condrocitos donde se marcó el ADN fragmentado (TUNEL) después de la incubación con 10% (control negativo) ó 0.5% de SFB en ausencia o presencia de concentraciones ascendentes de PRL. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes \pm e. e. del porcentaje de células positivas normalizadas al control negativo. B) Cuantificación mediante ELISA del ADN fragmentado presente en extractos de condrocitos incubados en 10 ó 0.5% de SFB en ausencia o presencia de concentraciones variables de PRL.

Los resultados son el promedio \pm e. e. de tres experimentos independientes normalizados al control. * $p < 0.05$ vs 10% SFB. ** $p < 0.05$ vs 0.5% SFB sin PRL.

En conclusión, encontramos que la PRL puede favorecer la sobrevivencia de los condrocitos y que este efecto probablemente involucra la forma larga de su receptor (ver anexo; Zermeño, *et al.*, 2006). La observación de que los condrocitos sufren apoptosis en respuesta a la disminución del SFB en el medio de cultivo (0.5%), concuerda con lo observado en otros estudios *in vitro* donde se utilizó 0% SFB en condrocitos de pollo, de rata, de humano o de conejo (Ishizaki *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1998). Estos hechos indican que, al igual que la mayoría de las células de vertebrados, los condrocitos requieren de factores de crecimiento para su sobrevivencia. Varias hormonas y factores de crecimiento promueven la sobrevivencia de condrocitos en cultivo, incluyendo a la dexametasona, la insulina, el FGF, el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y el IGF-1 (Quarto *et al.*, 1992; Ishizaki *et al.*, 1994; Gruber *et al.*, 2000; Lo y Kim, 2004). Nuestros resultados nos permiten agregar a la PRL a esta lista de factores.

El cartílago articular recubre la superficie de los huesos que forman las articulaciones móviles y es un tejido post-mitótico en el cual el recambio celular es mínimo. Debido a ello la preservación de la viabilidad celular es esencial para su correcta funcionalidad (Aigner y Kim, 2002). Dado que el cartílago es avascular, los factores de sobrevivencia provenientes del líquido sinovial deben ser capaces de difundir a través del tejido articular. Sin embargo, debido a la escasa distribución de los condrocitos dentro de la matriz extracelular, es posible que un mecanismo autócrino de sobrevivencia también exista, y en efecto los condrocitos producen factores promotores de la sobrevivencia (Ishizaki *et al.*, 1994). A este respecto, es importante recordar que la PRL es un componente del líquido sinovial (Ogueta *et al.*, 2002; Rovensky *et al.*, 2005), y podría provenir del plasma, ya que la mayoría de las proteínas con un peso molecular menor a 100 kDa se transfieren fácilmente de un espacio a otro (Perman, 1980). Además del posible origen plasmático de la PRL articular, en este estudio demostramos que la PRL puede ser generada por los mismos condrocitos, los cuales también expresan al receptor de la PRL. Los receptores de PRL han sido detectados en condrocitos del cartílago de las diáfisis de los dedos de ratas neonatas (Coss *et al.*, 2000), así como en células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea que se diferencian hacia condrocitos (Ogueta *et al.*, 2002). Los receptores de PRL existen en diversas isoformas que difieren principalmente en la secuencia y longitud de sus dominios citoplasmáticos (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Es interesante hacer notar que cuando las células mesenquimales se diferencian hacia condrocitos, se ha observado un cambio en la expresión del RPRL, la cual pasa de la isoforma intermedia hacia la isoforma larga (Ogueta *et al.*, 2002). En este estudio, nosotros mostramos que los condrocitos del cartílago articular expresan precisamente la isoforma larga del RPRL, la cual es claramente funcional dado que la PRL protegió a los condrocitos de la apoptosis inducida por la deprivación de SFB.

Para completar la observación de que los condrocitos responden a la PRL *in vitro*, determinamos la acción de la PRL sobre la función del cartílago *in vivo*. Con el propósito de investigar el efecto de la PRL sobre la apoptosis de los condrocitos *in vivo* desarrollamos un modelo de apoptosis inducida por la administración intra-articular de una combinación de citocinas pro-inflamatorias que incluye a la IL-1 β , al INF- γ y al TNF- α , que denominamos “citomix” (Park *et al.*, 2003), y analizamos si la administración intra-articular de PRL exógena o el aumento de los niveles séricos de PRL (secundario al trasplante de adenohipófisis a la

cápsula renal), eran capaces de contrarrestar la acción del *citomix*. Así, ratas macho de la cepa Lewis fueron inyectados intra-articularmente con el *citomix* y sacrificadas 48 h después de la inyección, para valorar la apoptosis en secciones de las articulaciones inyectadas por el método de TUNEL, seguido de la cuantificación del efecto mediante un sistema computacional de análisis de imágenes. Los resultados muestran que la inyección de *citomix* en la cavidad sinovial de la articulación femoral indujo la apoptosis de numerosos condrocitos ubicados en los márgenes de las superficies articulares (Fig. 9). La intensidad del TUNEL hace que dicha reacción se aprecie a bajos aumentos como una línea continua (Fig. 9B y D), ausente en articulaciones inyectadas con vehículo (Fig. 9A y C).

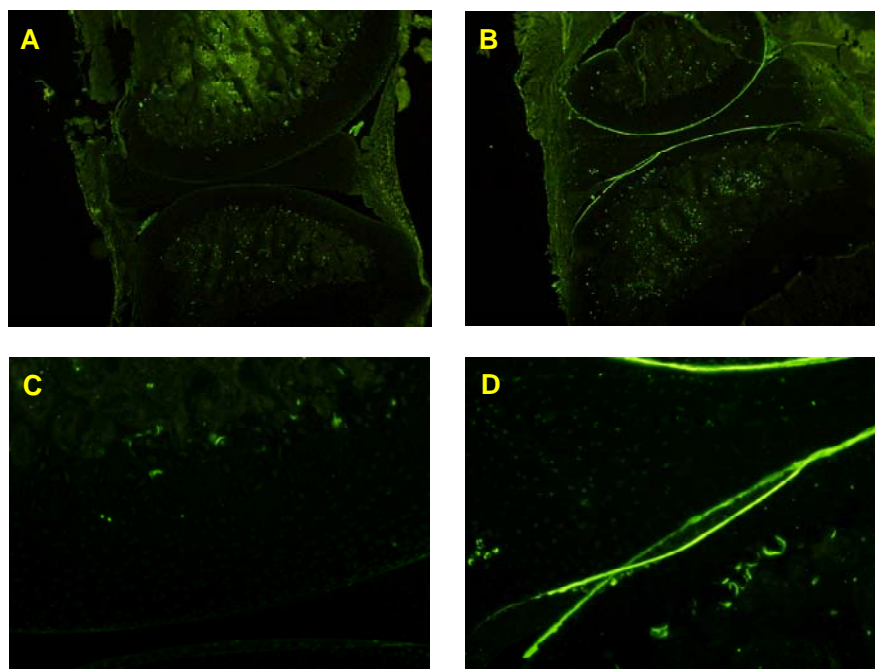


Figura 9. Análisis por TUNEL de la apoptosis de condrocitos del cartílago articular inducida por inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias (*citomix*). Magnificación 10x (A y B) y magnificación 20x (C y D). En las rodillas tratadas con *citomix* (B y D), la marca fluorescente indica apoptosis en el cartílago articular, esta marca no se observa en A y C, las controles inyectadas con vehículo; lo cual sugiere fuertemente que las citocinas pro-inflamatorias son un buen modelo para inducir apoptosis de condrocitos *in vivo*.

La amplificación de la imagen revela claramente la reacción positiva del TUNEL en los núcleos de los condrocitos marginales del cartílago articular (Fig. 10).

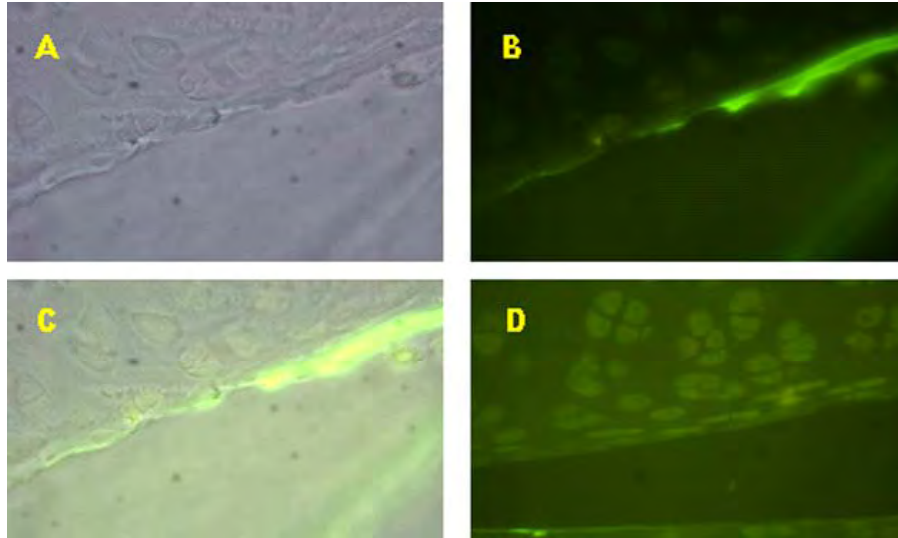


Figura 10. Micrografías representativas tomadas con objetivo de inmersión 100x donde se observa la reacción positiva del TUNEL en los condrocitos. A) Campo claro de condrocitos en apoptosis. B) Fluorescencia de condrocitos en apoptosis. C) Superposición de campo claro + fluorescencia en donde se revela que son los núcleos de los condrocitos marginales los teñidos positivamente. D) Control negativo inyectado con vehículo.

La tinción nuclear por DAPI mostrada en la figura 11, resalta la existencia de ADN fragmentado en los núcleos de los condrocitos que bordean el cartílago articular y confirma que una intensa tinción fluorescente del ADN genera la imagen de una línea positiva. Proponemos que a mayor fragmentación del ADN, mayor es también la incorporación del DAPI, con lo cual se genera una imagen fluorescente más intensa. Los núcleos celulares se consideran normales cuando se observa una fluorescencia homogénea y brillante (ver corte de cartílago con vehículo). Los núcleos apoptóticos pueden ser identificados por la cromatina condensada cercana a la periferia de la membrana nuclear (ver corte con *citomix*) o por una morfología fragmentada de los cuerpos nucleares (Gewies, 2006).

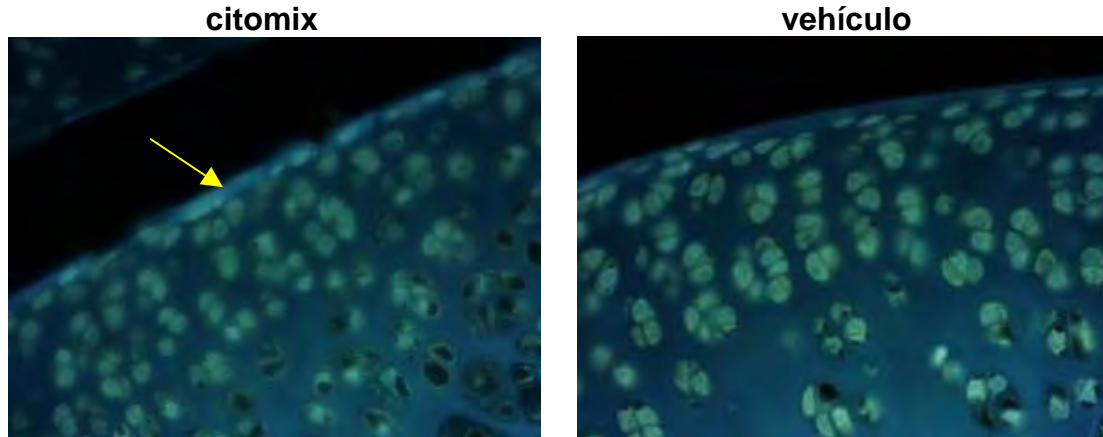


Figura 11. Tinción por DAPI de los núcleos de los condrocitos de la articulación de la rodilla de rata tratadas con *citomix* o con vehículo. Los núcleos en las tratadas con vehículo están bien definidos mientras que en las tratadas con *citomix* se encuentran difusos y se observan más vacuolas vacías. La flecha señala la línea que se observa en el margen externo del cartílago articular. Magnificación 60x.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte donde se describe la inducción de apoptosis en condrocitos articulares por la inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias. Desconocemos por qué sólo responden los condrocitos de la capa más externa del cartílago, si bien pensamos que pudiera deberse a la tasa de penetración del *citomix* difundiendo a través de la matriz del cartílago. Estos hallazgos son particularmente relevantes debido a que las citocinas son consideradas determinantes en la progresión de la AR (McInnes y Schett, 2007) y de la OA (Hedbom y Häuselmann, 2002). Se sabe que las concentraciones de las mismas se incrementan en la circulación y en el líquido sinovial (Christodoulou y Choi, 2006) de los pacientes con dichos padecimientos. Por ejemplo, en el líquido sinovial de pacientes con AR la IL-1 β llega a concentraciones de 130 pg/ml, el INF- γ de 4.5 U/ml y el TNF- α de 0.4 ng/ml; y en pacientes con OA la IL-1 β , el INF- γ y el TNF- α alcanzan concentraciones de 27.8 pg/ml, 6.7 U/ml y 0.5 ng/ml respectivamente (Westacott *et al.*, 1990). Se conocen acciones indirectas de las citocinas pro-inflamatorias sobre la degradación del cartílago como el promover la proliferación y la angiogénesis de la membrana sinovial que al formar el panus invade y destruye al cartílago (Christodoulou y Choi, 2006), así como la activación de proteasas de matriz y la inducción de la producción de óxido nítrico (NO) (Blom *et al.*, 2007). En contraste con estas observaciones, existen evidencias obtenidas en condrocitos en cultivo que indican que las citocinas por sí mismas no son suficientes para estimular la apoptosis tras 48 h de incubación (Blanco *et al.*, 1995), lo que sí ocurre en presencia de “secuestradores” de radicales de oxígeno. Además, en el estudio de Blanco *et al*

(1995), no se utilizó la misma combinación de citocinas pro-inflamatorias que en el nuestro, las diferencias entre los resultados de estos autores y los nuestros podrían deberse al requerimiento *in vivo* de cofactores aún sin identificar, o a que la acción pro-apoptótica del *citomix* no ocurra de forma directa sobre los condrocitos sino mediada por otros tipos celulares presentes en la articulación. Estas dos posibilidades se encuentran en proceso de estudio en nuestro laboratorio.

Con el fin de evaluar el efecto protector de la PRL sobre la apoptosis inducida por el *citomix*, administramos PRL conjuntamente con las citocinas en la articulación femoro-tibial. Las rodillas inyectadas fueron incluidas en parafina y reveladas mediante la técnica de TUNEL. Se cuantificó la señal positiva fluorescente del TUNEL utilizando el “line profile” del programa Image Pro-Plus® que mide la intensidad de una única línea de píxeles [píxeles por micra] y los valores del área bajo la curva de intensidad fueron graficados (Fig. 12B). De acuerdo a la cuantificación y a lo observado en las imágenes (Fig. 12A), la administración de las citocinas pro-inflamatorias tuvo un efecto pro-apoptótico (Fig. 12Ab, 15.22 ± 4.8 vs 7 ± 2.3 píxeles/ μ). Este efecto es específico del *citomix*, ya que en el corte de la rodilla control (tratada exclusivamente con PRL), no se observa la marca de TUNEL en dicha región (Fig. 12Aa). Notablemente, el co-tratamiento con PRL (Fig. 12Ac) redujo significativamente el nivel de apoptosis generado por el *citomix*.

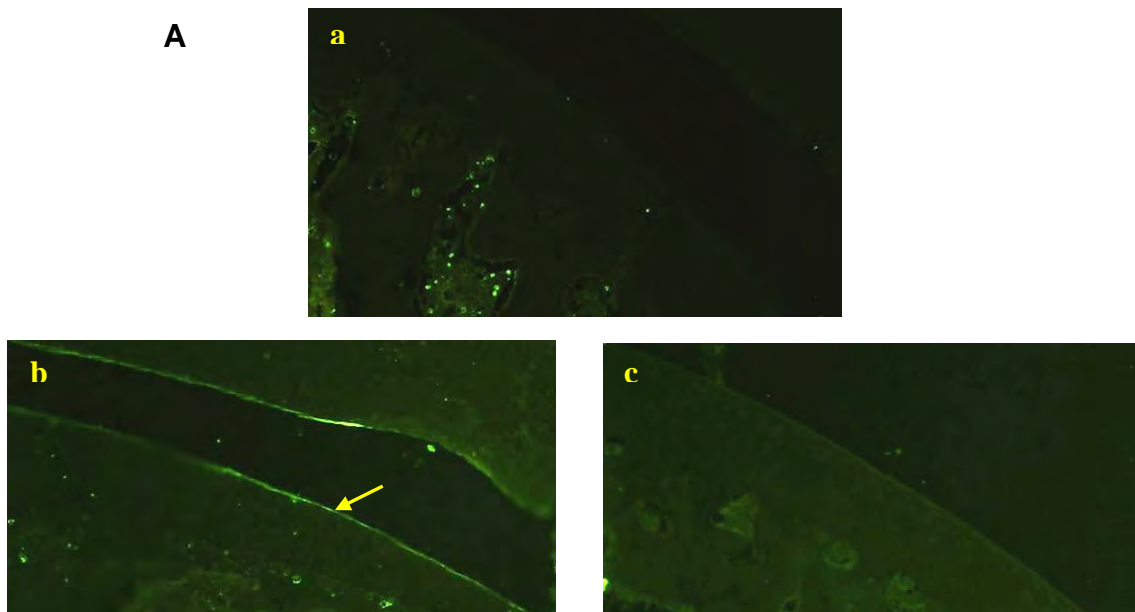
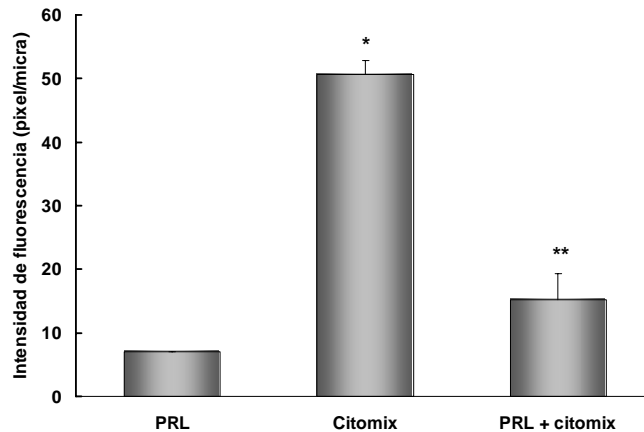


Figura 12. Análisis por TUNEL de la apoptosis de condrocitos del cartílago articular inducida por inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias. A) Micrografías representativas de rodillas de ratas normales a) control inyectada con PRL ($\sim 3.5 \mu\text{M}$), b) inyectada con *citomix*. La flecha indica la marca de condrocitos marginales en apoptosis y c) co-inyectada con PRL + *citomix*. Magnificación 10X.

B

B) Intensidad de la marca por TUNEL cuantificada con line profile. En ratas control inyectadas con citocinas pro-inflamatorias el valor de la reacción fue 5 veces mayor al nivel basal observado en las inyectadas con PRL (50.6 ± 4.1 vs 7 ± 2.3 pixeles/ μm , * $P < 0.05$). En ratas que fueron co-inyectadas con PRL + *citomix* el valor de reacción fue 3 veces menor al observado en las inyectadas únicamente con *citomix* (15.21 ± 4.8 vs 50.6 ± 4.1 pixeles/ μm , ** $P < 0.05$).

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto anti-apoptótico de la PRL en un modelo *in vivo*. Sin embargo dado que la cantidad de PRL inyectada fue muy alta ($8\mu\text{g}$) y su concentración calculada estaría en el orden de aproximadamente $3.5 \mu\text{M}$ si se considera un volumen de la cavidad sinovial en la rata de aproximadamente $100 \mu\text{L}$, nos propusimos analizar si un estado de hiperprolactinemia moderada pudiera tener efecto anti-apoptótico en los condrocitos. En realidad la pregunta sobre la concentración fisiológica de PRL en el espacio intersticial de los condrocitos es difícil de estudiar, dado que como hemos mostrado los condrocitos producen a la PRL y en su microambiente podrían encontrarse niveles muy altos de la proteína. En cualquier caso, empleamos un modelo de hiperprolactinemia inducida por la implantación de dos adenohipófisis bajo la cápsula renal. En los animales implantados la concentración de la PRL circulante aumentó ligera pero significativamente (Fig. 13). Dichos niveles fueron menores a los comúnmente encontrados en ciertos estadios reproductores como la ovulación y la lactancia, donde los niveles de PRL alcanzan a ser de 10 a 20 veces mayores que los basales (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), y a los reportados en la circulación de pacientes con prolactinomas donde se han llegado a alcanzar concentraciones de hasta 6000 ng/ml (Kars *et al.*, 2006). Sabemos que la PRL circulante puede incorporarse al líquido sinovial, ya que a dicho compartimento pueden difundir proteínas con pesos menores a 100 kDa (Perman, 1980). Para determinar la especificidad del posible efecto de la PRL sistémica sobre la apoptosis de los condrocitos inducida por la inyección intra-articular del *citomix*, incluimos un grupo adicional de ratas con implantes adenohipofisiarios tratadas durante 7 días con bromocriptina. La bromocriptina es un agonista dopaminérgico que bloquea la secreción de la PRL

hipofisiaria y que se sabe que también actúa directamente sobre adenohipófisis ectópicas frenando la secreción de PRL (McNeilly *et al.*, 1979). Efectivamente, en la figura 13 se muestra que el tratamiento con bromocriptina disminuyó significativamente la hiperprolactinemia en animales implantados hasta los niveles de las ratas control sin implante.

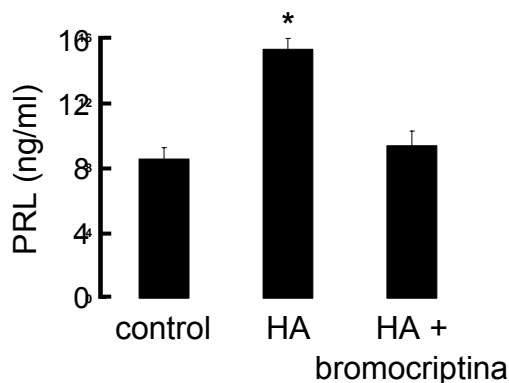


Figura 13. Evaluación por ELISA de la concentración de PRL circulante en ratas Lewis controles y transplantadas inyectadas o no con bromocriptina. Quince días después del implante (HA) las ratas implantadas mostraron un aumento significativo en la concentración circulante de PRL (hiperprolactinemia) respecto a las ratas no operadas (15.28 ± 0.7 ng/ml vs 8.53 ± 0.7 ng/ml; $*p < 0.05$) y las ratas HA inyectadas con bromocriptina no muestran una diferencia significativa respecto al control.

Ratas hiperprolactinémicas y ratas controles fueron inyectadas intra-articularmente con *citomix* en el día 13 después del implante y sacrificadas 48h después de la inyección intra-articular. Los resultados mostraron que las citocinas pro-inflamatorias no tuvieron efecto pro-apoptótico en las ratas implantadas pero sí en las controles sin implante (Fig. 14). Notablemente, el tratamiento con bromocriptina revirtió el efecto protector de los implantes. Estos resultados apoyan la noción de que la acción protectora de los implantes se debe a la hiperprolactinemia y por lo tanto refuerzan la acción anti-apoptótica *in vivo* de la PRL. Además, indican que dicha acción es ejercida por la PRL sistémica, de manera que cambios en los niveles circulantes de esta hormona podrían tener repercusiones importantes en el tratamiento y pronóstico de los trastornos degenerativos de la articulación. El uso de la bromocriptina permitió validar la especificidad de estas acciones.

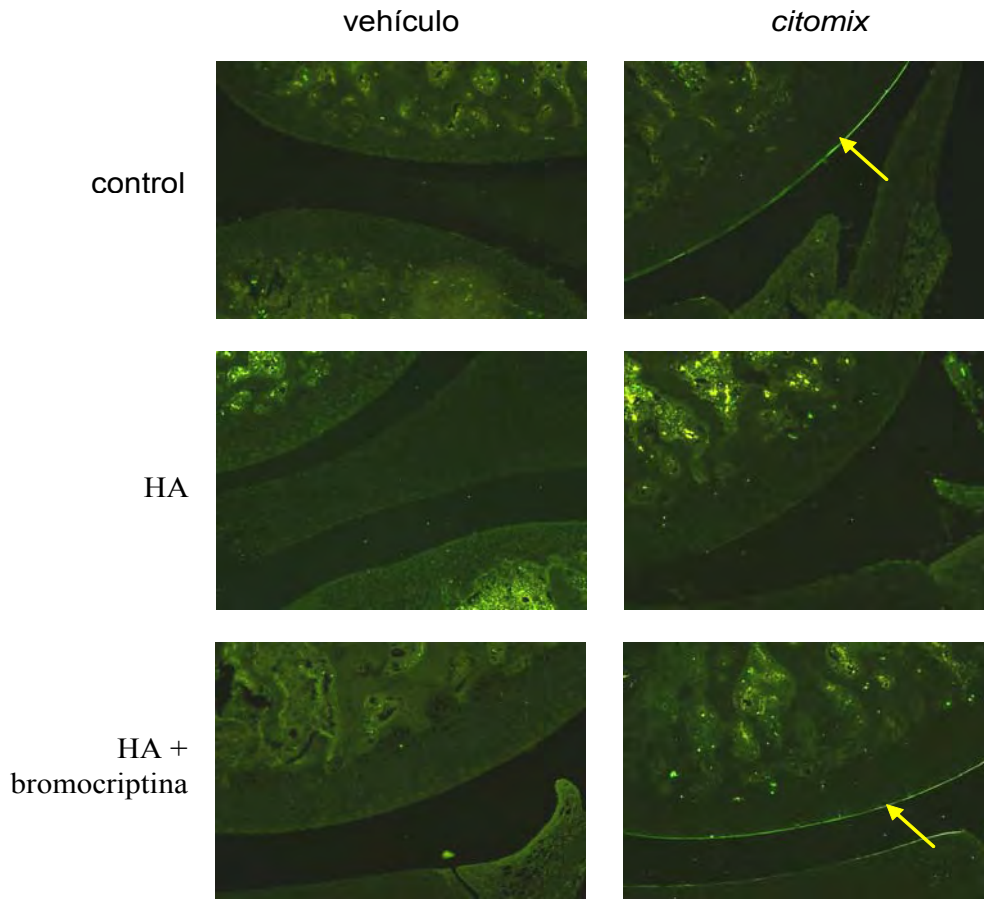


Figura 14. Micrografías representativas de cortes histológicos de las articulaciones evaluados por TUNEL de ratas Lewis controles e implantadas (HA) inyectadas o no con bromocriptina a las que se les inyectaron citocinas o vehículo. Magnificación 10x. En las ratas no HA el *citomix* indujo apoptosis en el cartílago, la cual se ve disminuída en el grupo HA. En todas las ratas del grupo HA inyectado con bromocriptina hubo una fuerte señal positiva a apoptosis en los condrocitos del cartílago articular. La flecha señala la marca positiva de TUNEL en el borde externo del cartílago articular.

Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas cuando se cuantificó la intensidad de la señal en articulaciones provenientes de seis animales distintos (Fig.15). Llama la atención que la hiperprolactinemia es ligera y sin embargo el efecto fue muy potente. Dado que con este modelo de hiperprolactinemia se logra una exposición a la hormona moderada pero continua, es interesante señalar que dicho régimen logra igualar el efecto observado a la exposición aguda y a mayor dosis que se logra con la PRL inyectada intra-articularmente.

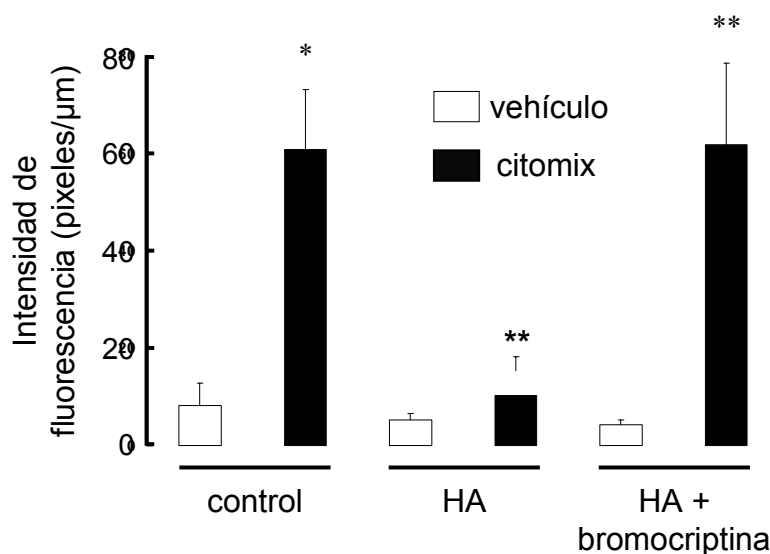


Figura 15. La gráfica ilustra la intensidad de la marca por TUNEL cuantificada con Image Pro-Plus ®. En las ratas control inyectadas con *citomix* el valor de la reacción de TUNEL fue 7 veces mayor al nivel basal observado en las ratas control inyectadas con el vehículo (60.77 ± 12.26 vs 8.17 ± 4.71 píxeles/μm, * $p < 0.01$). En las ratas hiperprolactinémicas (HA) la inyección con *citomix* no tuvo efecto pro-apoptótico (14.08 ± 4.10 vs 8.17 ± 4.71 píxeles/μm). Y finalmente, en las ratas donde se revirtió la hiperprolactinemia con bromocriptina, la inyección con *citomix* indujo una reacción positiva de apoptosis 5 veces mayor a la inducida por el vehículo (76.54 ± 14.25 píxeles/μm, ** $p < 0.01$).

Los resultados obtenidos muestran que tanto la inyección intra-articular de PRL como la hiperprolactinemia disminuyen significativamente la apoptosis de los condrocitos del cartílago articular inducida por la inyección intra-articular de citocinas pro-inflamatorias, por lo que podemos decir que la PRL tiene un efecto protector sobre los condrocitos articulares. En conjunto, nuestros resultados nos permiten proponer la posibilidad del uso de la PRL para el tratamiento de artropatías que cursan con degradación del cartílago articular como la AR y la OA. Ejemplos de lo anterior se ilustran en los reportes donde la lactancia, un estado funcional de hiperprolactinemia, parece proteger contra la OA y la AR (Cooley *et al.*, 2003; Karlson *et al.*, 2004). Otro estudio realizado en ratas macho hiperprolactinémicas mostró un retraso en el inicio de los signos y menor severidad de la artritis inducida por adyuvante completo de Freund (Neidhart y Flückiger, 1992). En pacientes con AR se han reportado niveles altos de PRL circulante (Mateo *et al.*, 1998; Seriole *et al.*, 2002), así como la expresión del ARN mensajero de la PRL en fibroblastos y leucocitos del tejido sinovial (Ogueta *et al.*, 2002). Además, se ha detectado PRL en el líquido sinovial de pacientes con AR, artritis post-traumática (Hedman *et al.*, 1992), y OA (Ogueta *et al.*, 2002). El aumento en los niveles de la

PRL en pacientes con artropatías, podría deberse al estrés y al dolor generados por la enfermedad (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), o a los altos niveles de citocinas pro-inflamatorias presentes en estos padecimientos, ya que se sabe que por ejemplo el TNF- α activa la transcripción del gen de la PRL en lactotrofos transformados GH3 (Friedrichsen *et al.*, 2006) y GH4C1 (Ramírez, 2007). También se ha sugerido que la PRL es inmunoestimulante y pudiera estar relacionada con la hiperactividad del sistema inmune en la AR. Se sabe que la PRL estimula las respuestas inmunes celular y humoral a través de acciones directas sobre distintos tipos de células inmunocompetentes (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). En este sentido, se ha reportado 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 AR (Nagafuchi *et al.*, 1999). Sin embargo la acción de la PRL sobre el sistema inmune es controversial ya que algunos autores han encontrado que la PRL estimula la proliferación de linfocitos (Hartmann *et al.*, 1989) y la función de los macrófagos (Bernton *et al.*, 1988) y estos efectos podrían ser mediados por la expresión de su receptor en células inmunes (Freeman *et al.*, 2000). Sin embargo, otros reportes mostraron que la función de las células NK (de sus siglas en inglés “natural killer”) era suprimida en pacientes con hiperprolactinemia (Vidaller *et al.*, 1992), que la proliferación de linfocitos por mitógenos, así como la producción de IL-2 estaban disminuidas (Vidaller *et al.*, 1986) y que la PRL incrementaba la producción de IFN- γ , IL-12 p70, IL-10, pero no del TNF- α en el suero de manera estímulo-específica (Matalka, 2003). Cabe mencionarse también un estudio de Hedman y colaboradores (1992), donde no se encontró diferencia significativa en los niveles séricos de la PRL entre pacientes con AR y sujetos control. La posibilidad de una mayor glicosilación de la PRL que altere su bioactividad, debería tomarse también en consideración al analizar los efectos de esta hormona en artropatías, ya que las inmunoglobulinas son glicosiladas de forma exagerada en pacientes con AR (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

Por su parte, el ratón knock-out para el RPRL, presenta diversos fenotipos como la infertilidad, problemas de lactancia y fallas en el comportamiento materno en las hembras, reducida formación de hueso, actividad locomotora alterada, y fallas en el desarrollo y función del tejido adiposo en machos y hembras. Sin embargo no se detectó ningún fenotipo significativo sobre el sistema inmune (Kelly *et al.*, 2001). Es importante hacer notar que la interrupción dirigida de la secuencia del gen del RPRL reduce el desarrollo y crecimiento del

hueso (Clément-Lacroix *et al.*, 1999), eventos dependientes de la osificación endocondral en la cual es necesario un fino balance entre la proliferación y la apoptosis de los condrocitos de la placa de crecimiento. Nuestros resultados preliminares en el ratón knock-out para el RPRL producido por recombinación homóloga (Ormandy *et al.*, 1997), en el cual estudiamos el efecto del *citomix* en ausencia de la acción de la PRL (Guzmán-Morales, Adán y Clapp, resultados no publicados), muestran una señal positiva de apoptosis más intensa que los ratones control (silvestres) en los que la PRL puede ejercer su acción condroprotectora.

En relación al mecanismo de acción mediante el cual la PRL inhibe la apoptosis de los condrocitos inducida por el *citomix*, se ha propuesto que el NO es un mediador de la destrucción del cartílago en la AR y en la OA a través de diferentes vías entre las cuales se encuentra el aumento de su producción por la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) inducida por citocinas pro-inflamatorias (Blanco y Fernández-Sueiro, 1998; Johnson *et al.*, 2000; Amin y Abramsom, 1998). En nuestro laboratorio hemos observado que en cultivos primarios de condrocitos las citocinas pro-inflamatorias aumentan la expresión de iNOS y que ésta no disminuye significativamente en presencia de la PRL (100nM). Esta falta de efecto de la PRL sobre la producción de NO se ha corroborado mediante la reacción de Griess, que mide los productos estables de la oxidación del NO (nitratos y nitritos), de acuerdo al método utilizado en nuestro laboratorio (Corbacho *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la PRL no tiene un efecto sobre la producción del NO inducida por las citocinas pro-inflamatorias, lo que nos ha conducido a investigar otras vías de señalización de apoptosis.

El aumento de la proteína p53 es uno de los principales mecanismos capaces de detener el ciclo celular para favorecer la reparación de ADN dañado o la apoptosis de diferentes estirpes celulares (Wosik *et al.*, 2003). Resultados preliminares obtenidos *in vitro* han mostrado un efecto inhibitorio de la PRL sobre la expresión inducida por las citocinas pro-inflamatorias del gen pro-apoptótico p53 (Guzmán-Morales, Perales y Clapp, resultados no publicados). La vía intrínseca de activación de la apoptosis se inicia por la acción de factores capaces de producir mutaciones en el ADN (factores cancerígenos, radiaciones, NO, etc.). Esto involucra el aumento de la proteína p53 que se asocia a un arresto del ciclo celular para favorecer la reparación de ADN dañado. En ausencia de dicha reparación se induce la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, además de la disminución en la síntesis de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-

2 y Bcl-xL. El desbalance a favor de las proteínas pro-apoptóticas provoca cambios iónicos en la membrana de la matriz de la mitocondria que inducen la apertura del poro mitocondrial y al escape del citocromo c (Li y Yuan, 1999). Se ha reportado la influencia de la PRL sobre la expresión de bcl2/bax (Krumenacker *et al.*, 1998) por lo que decidimos evaluar mediante RT-PCR en tiempo real la expresión del ARNm del cociente bcl2/bax. Experimentos preliminares sugieren que la PRL aumenta la expresión de la razón bcl2/bax. Finalmente, se sabe que como factor de sobrevivencia la PRL activa la vía de señalización de Akt (Bailey *et al.*, 2004), lo que nos llevó a estudiar también a través de Western blots la activación de esta vía como posible mediadora del efecto anti-apoptótico de la PRL en condrocitos. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la PRL induce la fosforilación de STAT3 y Akt en los condrocitos tratados con *citomix*.

Cabe destacar que nuestros resultados muestran por primera vez la presencia de las vasoinhibinas en extractos y medios condicionados de condrocitos del cartílago articular (ver Fig. 4). La producción de factores antiangiogénicos como las vasoinhibinas tiene mucho sentido en un tejido como el cartílago articular que depende de su avascularidad para mantener su integridad anatómica y funcional. La invasión de nuevos vasos durante el proceso de osificación fisiológica o patológica compromete las propiedades biomecánicas del cartílago y conlleva a su destrucción vía la activación de MMPs y la estimulación de la apoptosis de los condrocitos (Walsh, 1999; Horton *et al.*, 1998). De manera que tanto la inhibición de la angiogénesis del cartílago como el bloqueo de la apoptosis de los condrocitos tienen implicaciones clínicas relevantes para la formación, mantenimiento y reparación de este tejido. Hemos demostrado que las MMPs presentes en los condrocitos son capaces de generar vasoinhibinas a partir de la PRL (Macotela *et al.*, 2006). Dado que muchas de las MMPs se expresan normalmente en los 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 vasoinhibinas que actuarían manteniendo la avascularidad del cartílago. Sin embargo, en condiciones patológicas, existe una producción excesiva de MMPs (Chubinskaya *et al.*, 1999; Vincenti y Brinckerhoff, 2002), lo que induce a aumentar la degradación de las proteínas de matriz que son indispensables para una adecuada función articular. Es posible que esta alta producción de MMPs pudiera resultar en una actividad proteolítica excesiva sobre la PRL y sobre las mismas

vasoinhibinas, lo que resultaría en un desbalance homeostásico donde se perdiesen a la vez un factor anti-apoptótico y uno anti-angiogénico, favoreciendo el proceso patológico de destrucción del cartílago. Así pues, la demostración de que la PRL contiene en su molécula la capacidad de regular dos propiedades (avascularidad y sobrevivencia celular) esenciales para la funcionalidad del cartílago, refuerza su naturaleza de regulador local de este tejido y la señala como un candidato potencial para el tratamiento de los padecimientos que conducen a su destrucción.

7. CONCLUSIONES

1. Los condrocitos del cartílago articular expresan a la PRL y a las vasoinhibinas, así como a la isoforma larga del receptor de PRL.
2. La PRL inhibe la apoptosis inducida por deprivación de SFB en cultivos primarios de condrocitos
3. La PRL actúa a través de su receptor protegiendo a los condrocitos contra la apoptosis inducida por citocinas pro-inflamatorias. Ésto podría representar un factor pronóstico y terapéutico para el control de las enfermedades artríticas.

HIPÓTESIS QUE SE DERIVAN DEL PRESENTE ESTUDIO:

- El mecanismo anti-apoptótico de la PRL parece ser independiente de NO y dependiente de la fosforilación de STAT3 resultando en la activación de Akt que inhibe p53 y aumenta el ratio bcl2/bax.
- Las vasoinhibinas presentes en el cartílago articular podrían contribuir a mantener su avascularidad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahonen TJ, Harkonen PL, Laine J, Rui H, Martikainen PM, Nevalainen MT. **Prolactin is a survival factor for androgen-deprived rat dorsal and lateral prostate epithelium in organ culture.** *Endocrinology* 1999, **140**:5412-21.
- Aigner T, Kim HA. **Apoptosis and cellular vitality. Issues in osteoarthritic cartilage degeneration.** *Arthritis and Rheumatism* 2002, **46**:1986–96.
- Aigner T, McKenna L. **Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002, **59**:5–18.
- Alfaro E, García, C, Dueñas A. **Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones.** *Cancerología* 2000, **46**:275-80.
- Amin AR y Abramsom SB. **The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis.** *Current Opinion in Rheumatology* 1998, **10**:263-68.
- Anthony PK, Powers CA. **Characterization of cysteamine induction of the 22K prolactin variant in the rat pituitary.** *Neuroendocrinology* 1993, **57**:167-76.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo J, Nava G, López-Barrera F, Quiróz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005, **46**:2947-53.
- Asai-Sato M, Nagashima Y, Miyagi E, Sato K, Ohta I, Vonderhaar BK **Prolactin inhibits apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by serum starvation or cisplatin treatment.** *International Journal of Cancer* 2005, **115**:539–44.
- Bailey JP, Nieport KM, Herbst MP, Srivastava S, Serra RA, Horseman ND. **Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway.** *Molecular Endocrinology* 2004, **18**:1171-84.
- Bancroft JD, Stevens A. **Theory and practice of histological techniques.** Ed. Churchill Livingstone 1996, **4a Ed.** p. 314-22.

- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. **Extrapituitary Prolactin: distribution, regulation, function, and clinical aspects.** *Endocrine Reviews* 1996, **17**:639-69.
- Bernton EW, Meltzer MS, Holaday JW. **Suppression of macrophage activation and lymphocyte function in hypoprolactinemic mice.** *Science* 1988, **239**:401-04.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. **Sox9 is required for cartilage formation.** *Nature Genetics* 1999, **22**:85-89.
- Blanco FJ, Fernández-Sueiro LJ. **Artrosis: concepto, clasificación, epidemiología, y patogenia.** In: Pascual E, Rodríguez Valverde V, Carbonell J, Gomez-Reino J, editores. *Reumatología: Enfermedades del aparato locomotor* 1998, vol 1. Madrid: *Ed. Aran*, 1609-42.
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, De Toro FJ, Galdo F. **Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis.** *Arthritis and Rheumatism* 1998, **41**:284-89.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. **Chondrocytes apoptosis induced by nitric oxide.** *The American Journal of Pathology* 1995, **146**:75-85.
- Blom AB, van der Kraan PM, van den Berg WB. **Cytokine targeting in osteoarthritis.** *Current Drug Targets* 2007, **8**: 283-92.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. **Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.** *Endocrine Reviews* 1998, **19**:225-68.
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. **Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family.** *Cell* 1988, **53**:69-77.
- Buckley AR. **Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor.** *Lupus* 2001, **10**:684-90.
- Cardiel MH. **First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis.** *Rheumatology* 2006, **45**:ii7-ii22.

- Chomczynski P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochemistry* 1987, **162**:156-59.
- Christodoulou C, Choy EH. **Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis.** *Clinical and Experimental Medicine* 2006, **6**: 13-9.
- Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA. **Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints.** *Laboratory Investigation* 1999, **79**:1669-77.
- Clapp C, Sears PS, Nicoll CS. **Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone.** *Endocrinology* 1989, **125**:1054-59.
- Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. **Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function.** *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2006, **17**:301-07.
- Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N, Baron R, Kelly PA. **Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice.** *Endocrinology* 1999, **140**:96–105.
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. **The role of prolactin in mammary carcinoma.** *Endocrine Reviews* 2003, **24**:1-27.
- Cooley HM, Stankovich J, Jones G. **The association between hormonal and reproductive factors and hand osteoarthritis.** *Maturitas* 2003, **45**:257-65.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñas Z, Noris G, Morales MA, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms.** *Journal of Endocrinology* 2000, **166**:53–62.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martínez de la Escalera G, Freeman BA, Clapp C. **Proteolytic cleavage confers NO synthase inducing activity upon prolactin.** *The journal of Biological Chemistry* 2000, **275**:13183-86.

- Corbacho AM, Martínez de la Escalera, Clapp C. **Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis.** *Journal of Endocrinology* 2002, 173:219-38.
- Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA, Walker AM. **Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat.** *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2000, **279**:E1216–25.
- Davis JA, Linzer DIH. **Expression of multiple forms of the prolactin receptor.** *Molecular Endocrinology* 1989, **3**:674-80.
- Descalzi Cancedda F, Melchiori A, Benelli R, Gentili C, Masiello L, Campanile G, Cancedda R, Albini A. **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* 1995, **66**:60-68.
- Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, Aranda J, Macotella Y, Montes de Oca P, López-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suárez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Prolactin in the eye of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004, **45**:2049-55.
- Feng L, Precht P, Balakir R, Horton WE Jr. **Evidence of a direct role for Bcl-2 in the regulation of articular chondrocyte apoptosis under the conditions of serum withdrawal and retinoic acid treatment.** *Journal of Cellular Biochemistry* 1998, **71**:302–09.
- Fiore CE, D'Agata R, Clementi G, Palatino LS. **Prolactin and calcium metabolism: influence of hyperprolactinemia on immunoreactive parathyroid hormone levels in man and in the rat.** *Journal of Endocrinological Investigation* 1984, **7**:647-52.
- Freeman ME, Kanyieska B, Lerant A, Nagy G. **Prolactin: structure, function, and regulation of secretion.** *Physiological Reviews* 2000, **80**:1523–631.

- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA. **Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation.** *Journal of Clinical Investigation* 1997, **99**:1107-17.
- Friedrichsen S, Harper CV, Semprini S, Wilding M, Adamson AD, Spiller DG, Nelson G, Mullins JJ, White MR, Davis JR. **Tumor necrosis factor-alpha activates the human prolactin gene promoter via nuclear factor-kappaB signaling.** *Endocrinology* 2006 **147**:773-81.
- Genevois JP. **Anatomie et Physiologie Articulaires.** In: Laforge H. Encyclopédie Vétérinaire, 1992. Editions Techniques S.A., Paris, Orthopédie 0100
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.** *Nature Medicine* 1999, **5**:623-28.
- Gertner JM. **Normal and abnormal skeletal growth.** In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, Eds. Dynamics of bone and cartilage metabolism. San Diego, CA: *Academic Press*; 1999: 649.
- Gewies A. **ApoMethods** en www.celldeath.de 2006. Última fecha de consulta: 8 de febrero del 2008.
- Goldring MB. **Anticytokine therapy for osteoarthritis.** *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001, **1**:817-29.
- Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. **Anti-apoptotic effects of IGF-I and PDGF on human intervertebral disc cells *in vitro*.** *Spine* 2000, **25**:2153–57.
- Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW. **Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin.** *FASEB Journal* 1989, **3**:2194–202
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. **Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis.** *Arthritis and Rheumatism* 1998, **41**:1632-38.
- Hedbom E, Häuselmann HJ. **Molecular Aspects of Pathogenesis in Osteoarthritis: the role of inflammation.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002, **59**:45-53.

- Hedman M, Nilsson E, de la Torre B. **Low blood and synovial fluid levels of sulpho-conjugated steroids in rheumatoid arthritis.** *Clinical and Experimental Rheumatology* 1992, **10**:25-30.
- Hoffman T, Penel C, Ronin C. **Glycosilation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance.** *Journal of Endocrinology Investigation* 1993, **16**:807-16.
- Horton WE Jr, Feng L, Adams C. **Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease.** *Matrix Biology* 1998, **17**: 107-15.
- Ishizaki Y, Burne JF, Raff MC. **Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture.** *Journal of Cell Biology* 1994, **126**:1069–77.
- Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. **Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization.** *Arthritis and Rheumatism* 2000, **43**:1560-70.
- Johnston SA. **Osteoarthritis-joint anatomy, physiology and pathobiology.** *The Veterinary Clinics of North America - Small animal practice* 1997, **27**: 699-723.
- Justen HP, Grunewald E, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Wessinghage D, Vetter H, Schulze-Osthoff K, Ko Y. **Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** *Molecular Cell Biology Research Communications* 2000, **3**:165-72.
- Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. **Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study.** *Arthritis and Rheumatism* 2004, **50**:3458-67.
- Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. **Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction.** *Immunology Letters* 2006, **106**:8-13.
- Kars M, Roelfsema F, Romijn JA, Pereira AM. **Malignant prolactinoma: case report and review of the literature.** *European Journal of Endocrinology* 2006, **155**:523-34.

- Kelly PA, Binart N, Lucas B, Bouchard B, Goffin V. **Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice.** *Frontiers in Neuroendocrinology* 2001, **22**:140–45.
- Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A. **Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002, **59**:27-35.
- Kim HA, Song YW. **Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis.** *Arthritis and Rheumatism* 1999, **42**:1528–37.
- Kouri JB, Rosales-Encina JL, Chaudhuri PP, Luna J, Mena R. **Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: a microscopy report.** *Journal of Medical Science Research* 1997, **25**:245–48.
- Krumenacker JS, Buckley DJ, Leff MA, McCormack JT, de Jong G, Gout PW, Reed JC, Miyashita T, Magnuson NS, Buckley AR. **Prolactin-regulated apoptosis of Nb2 lymphoma cells: pim-1, bcl-2, and bax expression.** *Endocrine* 1998, **9**:163-70.
- Kühn K, D’Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. **Cell death in cartilage [review].** *Osteoarthritis and Cartilage* 2004, **12**:1-16.
- Levy DE, Lee C. **What does Stat3 do?** *Journal of Clinical Investigation* 2002, **109**:1143-48.
- Li H, Yuan J. **Deciphering the pathways of life and death.** *Current Opinion in Cell Biology* 1999, **11**:261-66.
- Lo MY, Kim HT. **Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-I.** *Journal of Orthopaedic Research* 2004, **22**:140–44.
- Loneux P, Balligand M. **L'ostéoarthrose chez le chien. I. Pathophysiologie et Diagnostic.** *Annales de Médecine Vétérinaire* 1999, **143**:153-62.
- López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. **Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, **14**:660-69.

- Macotella Y, Aguilar M, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavallo C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Matrix metalloproteases from chondrocytes generate antiangiogenic 16K-prolactin.** *Journal of Cell Science* 2006, **119**:1790-800.
- Manicourt DH, El Hajjaji H, Devogelaer JP, Thronar MA. **Products of cartilage metabolism.** In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, Eds. Dynamics of bone and cartilage metabolism. San Diego, CA: *Academic Press*; 1999: 301.
- Matalka KZ. **Prolactin enhances production of interferon-gamma, interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor-alpha, in a stimulus-specific manner.** *Cytokine* 2003 **21**:187-94.
- Mateo L, Nolla JM, Bonnin MR, Navarro MA, Roig-Escofet D. **High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis.** *Journal of Rheumatology* 1998, **25**:2077-82.
- McInnes IB, Schett G. **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Nature Reviews. Immunology* 2007. **7**: 429-42.
- McNeilly AS, de Kretser DM, Sharpe RM. **Modulation of prolactin, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) secretion by LHRH and bromocriptine (CB154) in the hypophysectomized pituitary-grafted male rat and its effect on testicular LH receptors and testosterone output.** *Biology of Reproduction* 1979, **21**:141-47.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation.** *Developmental Cell* 2002, **3**:439-49.
- Mistry D, Oue Y, Chambers MG, Kayser MV, Mason RM. **Chondrocyte death during murine osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:131-41.
- Monfort J, García-Giralt N, López-Armada MJ, Monllau JC, Bonilla A, Benito P, Blanco FJ. **Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation.** *Arthritis Research & Therapy* 2006, **8**:R149.

- Moro M, Inada Y, Miyata H, Komatsu H, Kojima M, Tsujii H. **Effects of dopamine d2 receptor agonists in a pituitary transplantation-induced hyperprolactinaemia/anovulation model in rats.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2001, **28**:651-58.
- Nagafuchi H, Szuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. **Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis.** *Journal of Rheumatology* 1999, **26**:1890-900.
- Nagano M, Kelly PA. **Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:13337-45.
- Neidhart M, Flückiger EW. **Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis.** *Immunology* 1992, **77**:449-55.
- Ogueta S, Muñoz J, Obregón E, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. **Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, **190**:51-63.
- Okamura H, Zachwieja J, Raguet S, Kelly PA. **Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor.** *Endocrinology* 1989, **124**:2499–508.
- Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. **Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse.** *Genes and Development* 1997, **11**:167-78.
- Park H, Ahn Y, Park CK, Chung HY, Park Y. **Interleukin-6 protects MIN6 beta cells from cytokine-induced apoptosis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, **1005**:242-49.
- Peirce SK, Chen WY. **Human PRL and its antagonist, hPRL-C129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice.** *Oncogene* 2004, **23**:1248–55.
- Pérez-López FR, Robyn C. **Studies on human prolactin physiology.** *Life Sciences* 1974; **15**:599-616.

- Perks CM, Newcomb PV, Grohmann M, Wright RJ, Mason HD, Holly JM. **Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells.** *Human Reproduction* 2003, **18**:2672-77.
- Perman V. **Synovial fluid.** In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 1980. (3^a ed) (Ed. J. Kaneko), pp. 749-83. New York: Academic Press.
- Ploszaj T, Motyl T, Orzechowski A, Zimowska W, Wareski P, Skierski J, Zwierzchowski L. **Antiapoptotic action of prolactin is associated with up-regulation of Bcl-2 and downregulation of Bax in HC11 mouse mammary epithelial cells.** *Apoptosis* 1998, **3**:295–304.
- Polzer K, Schett G, Zwerina J. **The lonely death: chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis.** *Autoimmunity* 2007, **40**:333-36.
- Poole AR. **The growth plate: cellular physiology, cartilage assembly and mineralization.** In *Cartilage: Molecular Aspects*, 1991 Eds BK Hall & SA Newman. Florida, USA: CRC Press. pp 179–211.
- Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B. **Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis.** *Journal of Cell Biology* 1992, **119**:989–95.
- Ramírez M. **Los efectos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) sobre la expresión y secreción de prolactina en la hipófisis.** *Tesis de Maestría*. Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla 2007, 34.
- Rovensky J, Imrich R, Radikova Z, Simorova E, Greguska O, Vigas M, Macho L. **Peptide hormones and histamine in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** *Endocrine Regulations* 2005, **39**:1–6.
- Ruffion A, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Eaton CL, Hamdy FC, Dobson PR. **The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells.** *European Urology* 2003, **43**:301–08.
- Seriola B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. **Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002, **966**:258-62.

- Sinha YN. **Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance.** *Endocrine Reviews* 1995, **16**:354-69.
- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. **PRL anti-apoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity.** *Endocrinology* 2001, **142**:4086–94.
- Trippel SB, Mankin HJ. **Articular cartilage healing.** In: Bojrab J. *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery*, 2nd Edition. 1993 Lea & Febiger, USA.
- Tzeng SJ, Linzer DIH. **Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo.** *Molecular Reproduction and Development* 1997, **48**:45-52.
- Verset M. **Tesis étude expérimentale des lésions macroscopiques et histologiques d'arthrose du genou 90 jours après rupture chirurgicale du ligament croisé antérieur chez le chien.** *Tesis de licenciatura.* Université Claude Bernard-Lyon I 2005, 20.
- Vidaller A, Llorente L, Larrea F, Méndez JB, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. **T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: effect of bromocriptine treatment.** *Clinical Immunology and Immunopathology* 1986, **38**:337–43
- Vidaller A, Guadarrama F, Llorente L, Méndez JB, Larrea F, Villa AR *et al.*, **Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient.** *Journal of Clinical Immunology* 1992, **12**:210–15.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. **Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.** *Arthritis Research* 2002, **4**:157-64.
- Walsh DA. **Angiogenesis and arthritis.** *Rheumatology* 1999, **38**:103-12.
- Wang YF, Walker AM. **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* 1993, **133**:2156-60.

- Westacott CI, Wicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA. **Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 1990, **49**:676-81.
- Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Bruck W, Massie B, Nalbantoglu J. **Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53.** *Journal of Neurochemistry* 2003, **85**:635–44.
- Yatsugi N, Tsukazaki T, Osaki M, Koji T, Yamashita S, Shindo H. **Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc.** *Journal of Orthopaedic Science* 2000, **5**:150-56.
- Yu-Lee LY. **Molecular actions of prolactin in the immune system.** *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1997, **215**:35-52.
- Zermeño C*, Guzmán-Morales J*, Macotela Y, Nava G, López-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation.** *Journal of Endocrinology* 2006, **189**:R1-8.

RAPID COMMUNICATION

Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation

C Zermeño*, J Guzmán-Morales^{1*}, Y Macotela¹, G Nava¹,
F López-Barrera¹, J B Kouri, C Lavalle, G Martínez de la Escalera¹
and C Clapp¹

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, 07360, México

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, México

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

*C Zermeño and J Guzmán-Morales contributed equally to this work

Abstract

The apoptosis of chondrocytes plays an important role in endochondral bone formation and in cartilage degradation during aging and disease. Prolactin (PRL) is produced in chondrocytes and is known to promote the survival of various cell types. Here we show that articular chondrocytes from rat postpubescent and adult cartilage express the long form of the PRL receptor as revealed by immunohistochemistry of cartilage sections and by RT-PCR and Western blot analyses of the isolated chondrocytes. Furthermore, we demonstrate that PRL inhibits the apoptosis of these same chondrocytes cultured in low-serum.

Chondrocyte apoptosis was measured by hypodiploid DNA content determined by flow cytometry and by DNA fragmentation evaluated by the ELISA and the TUNEL methods. The anti-apoptotic effect of PRL was dose-dependent and was prevented by heat inactivation. These data demonstrate that PRL can act as a survival factor for chondrocytes and that it has potential preventive and therapeutic value in arthropathies characterized by cartilage degradation.

Journal of Endocrinology (2006) **189**, R1–R8

Introduction

Chondrocytes are the only cells residing in cartilage and are responsible for the formation, maintenance, and turnover of a variety of extracellular matrix proteins. Indeed, chondrocytes are essential for the function of the tissue; their death is an important feature of cartilage replacement during bone formation (Poole 1991), but in aging and disease it can lead to cartilage degradation (Aigner & McKenna 2002). Various lines of evidence suggest that apoptosis is the main type of death in chondrocytes. Apoptotic chondrocytes have been detected during endochondral ossification (Hatori *et al.* 1995, Zenmyo *et al.* 1996), in aging cartilage (Adams & Horton 1998), and in arthropathies characterized by cartilage destruction, such as rheumatoid arthritis (Kim & Song 1999) and osteoarthritis (Kouri *et al.* 1997, Goggs *et al.* 2003). In osteoarthritis, the major age-associated joint disease, increased chondrocyte apoptosis has been correlated with the severity of cartilage damage (Hashimoto *et al.* 1998).

Morphological and functional differences suggest that the mechanisms of chondrocyte apoptosis differ from those in other tissues (Roach *et al.* 2004, Pérez *et al.* 2005), but these mechanisms are unclear and little is known about the regulatory factors responsible for their control.

Prolactin (PRL) acts both as a circulating hormone and as a cytokine in a vast array of physiological functions that range from reproduction and osmoregulation to immunomodulation and angiogenesis (Bole-Feysot *et al.* 1998, Corbacho *et al.* 2002). In addition, PRL may serve as a regulatory factor for joint tissues. PRL can act directly on osteoblasts during development to regulate bone formation (Clément-Lacroix *et al.* 1999, Coss *et al.* 2000) and can activate synovial cell functions in rheumatoid arthritis (Nagafuchi *et al.* 1999). Furthermore, synovial fluid contains PRL (Ogueta *et al.* 2002) that may derive from plasma and/or may be produced locally. Indeed, PRL is expressed by synovial cells (Nagafuchi *et al.* 1999), chondrocytes (Macotela *et al.* 2006), and bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing

chondrogenic differentiation (Ogueta *et al.* 2002). In the latter, PRL may contribute to the acquisition of the chondrocytic phenotype as it stimulates the synthesis of proteoglycans and type II collagen (Ogueta *et al.* 2002). In support of chondrocytes being cellular targets of PRL, the PRL receptor has been detected in chondrocytes from neonatal rats (Coss *et al.* 2000), although its functional role remains to be determined. Because PRL is known to be a survival factor for various cell types (Ploszaj *et al.* 1998, Buckley 2001, Tessier *et al.* 2001, Ruffion *et al.* 2003, Perks *et al.* 2004, Asai-Sato *et al.* 2005) and chondrocyte survival is essential for cartilage function, the aim of the present work was to investigate whether the PRL receptor is expressed in articular chondrocytes from normal post-pubescent and adult cartilage and can mediate an action of PRL on cell survival.

Materials and Methods

Chondrocyte isolation

Articular chondrocytes were isolated from femoral epiphyseal cartilage of male, postpubescent, Wistar rats (8 weeks old, 130–150 g body weight (bw)) as described (Shakibaei *et al.* 1997) with modifications (Macotella *et al.* 2006). The cells were either stored immediately at -80°C for subsequent total RNA extraction, or processed for immunoprecipitation/Western blot analysis or cell culture experiments.

RT-PCR

Total RNA was extracted and quantified, and 5 μg were reverse transcribed in a 25- μl reaction using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega). Two-microliter aliquots were used for cDNA amplification by PCR using oligonucleotides specific for all forms of the PRL receptor (sense primer A: CCC CAA CTC CTG CTT CTT TAG, and antisense primer B: TAT TTT TGG CCC AGG AAC TA), or oligonucleotides specific for the short form (sense primer C: ATC CTG GGA CAG ATG GAG GAC, and antisense primer D: TGG CTG AGG CTG ACA AAA GAG), or for the long PRL receptor isoform (sense primer C, and antisense primer E: AGA CAG TGG GGC TTT TCT CCT). In all cases, amplification was for 40 cycles and for 30 s at 94°C , 45 s at 56°C , and 45 s at 72°C for primers A–B; and 30 s at 94°C , 45 s at 56°C , and 60 s at 72°C for primers C–D and C–E. The products resulting from reactions with primers A–B, C–D, and C–E were 582 bp, 1017 bp and 1344 bp respectively (Fig. 1A).

Immunoprecipitation/Western blot

Freshly isolated chondrocytes (2×10^6) were resuspended in lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS,

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7) and immunoprecipitated with anti-rat PRL receptor U-5 monoclonal antibody (U-5 MAb, 5 μg) using the previously reported technique (Corbacho *et al.* 2000). U-5 MAb is directed against the extracellular region of the PRL receptor (Okamura *et al.* 1989) and was a gift from P A Kelly from INSERM U-584, Paris, France. Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE on an 8% acrylamide gel under reducing conditions, then blotted and probed with a 1:500 dilution of U-5 MAb. The antigen–antibody complex was detected using the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad Laboratories).

Immunohistochemistry

Bones from the knee joint of adult rats (250 g bw) were dissected, fixed, decalcified, and dehydrated for paraffin embedding. After deparaffination and rehydration, longitudinal 6- μm paraffin sections were blocked with 2% bovine serum albumin, 1% normal goat serum, and 0.3% Triton-X in phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 1 h. Sections were then incubated overnight with a 1:100 dilution of U-5 or U-6 anti-rat PRL receptor MAbs. The U-6 MAb is also directed against the extracellular region of the PRL receptor (Okamura *et al.* 1989) and was provided by P A Kelly. Finally, after incubation with biotin-conjugated secondary antibody for 1 h, sections were developed using the avidin–biotin complex detection kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Chondrocyte culture

Chondrocytes were seeded (2×10^5 cells/ cm^2) on wells or on 1% fibronectin-coated glass coverslips and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin for 48 h at 37°C in the presence or absence of rat PRL (biological grade; National Hormone Pituitary Program, Torrance, CA, USA). Cells cultured in 10% FBS-DMEM served as negative control for apoptosis.

DNA labeling technique for flow cytometric analysis

At the end of the incubation, chondrocytes were trypsinized and sedimented. Cell pellets were fixed in 80% ethanol for 60 min at 4°C , washed twice, incubated with RNase (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 20 min at 4°C and stained with propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 15 min at 4°C in the dark. Propidium iodide fluorescence of nuclei was measured by flow cytometry on a fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with a 560 nm dichromatic mirror and a 600 nm band

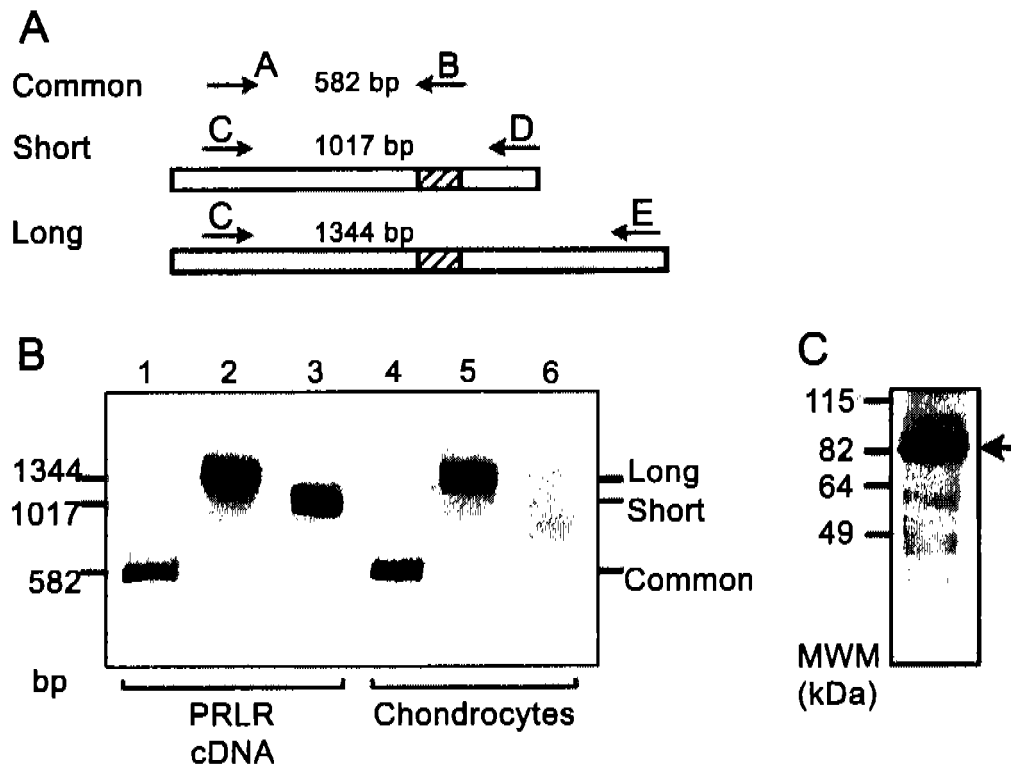


Figure 1 Expression of the long PRL receptor mRNA and protein in chondrocytes isolated from postpubescent rat articular cartilage. (A) Schematic representation of cDNAs encoding short and long forms of PRL receptor in the rat. The positions of oligonucleotide probes (arrows) complementary to sequences encoding the extracellular region (primer A and primer C) or the membrane domain (hatched area, primer B) common to all forms, or the cytoplasmic domain specific for the short form (primer D), or for the long form (primer E) are shown. Predicted sizes of PCR products for each primer combination are in basepairs (bp). (B) PCR products from reverse transcribed total RNA from chondrocytes (lanes 4, 5, and 6), or from rat PRL receptor cDNA (PRLR cDNA; lanes 1, 2, and 3) amplified with the three combinations of PRL receptor primers shown in (A). (C) Immunoprecipitation/Western blot analysis of PRL receptors in chondrocytes. Chondrocytes (2×10^6) were lysed, immunoprecipitated with U-5 anti-rat PRL MAb and blotted with the same U-5 MAb. The apparent molecular weights of markers (MWM) and an immunoreactive protein of 85 kDa (arrow) are indicated.

pass filter. For each sample, 10^4 cells were analyzed and percentage values denoted the proportion of propidium iodide positive cells.

TUNEL assay

Chondrocytes were fixed with fresh 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature and permeabilized by treatment with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate buffer (pH 7.4) for 2 min at 4 °C. Following permeabilization, apoptotic cells were visualized by the TUNEL method using a detection kit (Roche Diagnostics) and fluorescence microscopy.

Cell death ELISA

Fragmented nucleosomal DNA was measured using the ELISA kit from Boehringer Mannheim, according to the

manufacturer's instructions. After incubation, medium containing floating cells was harvested, and the cells on the plate were trypsinized briefly. Floating and trypsinized cells were combined, sedimented, counted, lysed in the lysis buffer of the kit and transferred to a microtiter plate to quantitate nucleosomes. The results are expressed as optical density units per 5×10^4 cells relative to those of control cells (incubated with 10% FBS).

Statistical analyses

All results were replicated in three or more independent experiments. Data are presented as the mean \pm S.E.M. As appropriate, Student's unpaired *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey's test to compare individual means was used for statistical comparisons. The significance level was set at 5%.

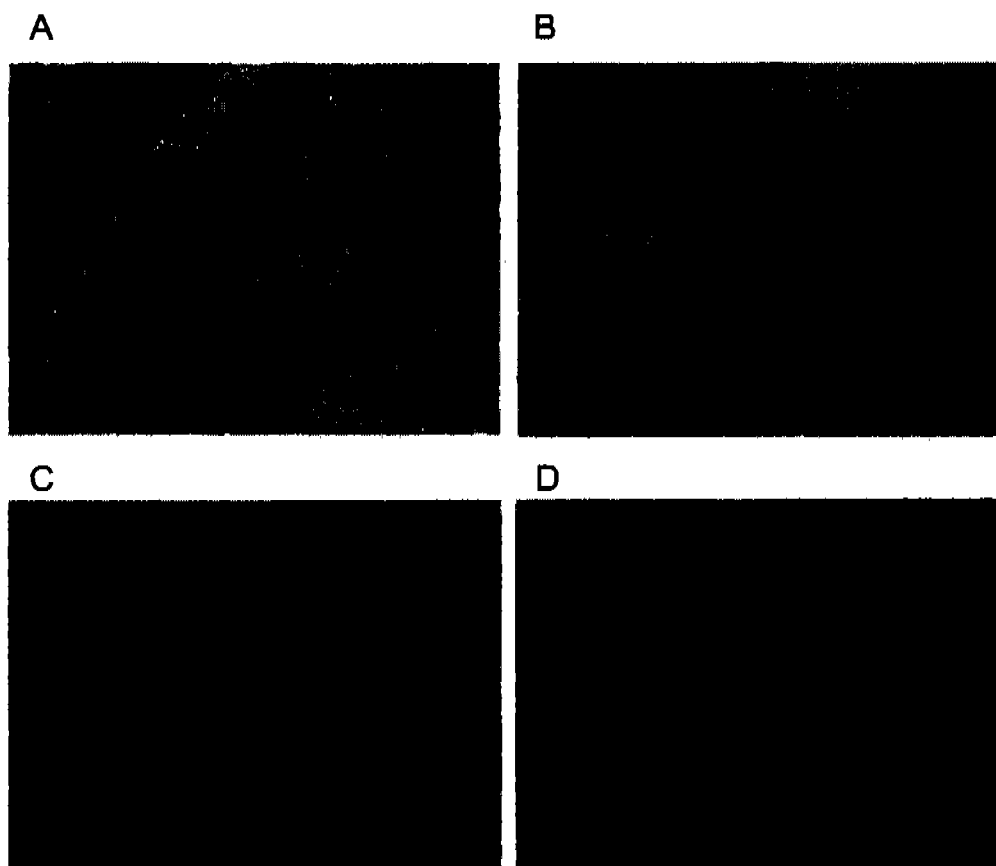


Figure 2 Immunohistochemical detection of PRL receptors in articular chondrocytes. Sections of femoral heads from adult rats immunolabeled with the U-5 (B) or the U-6 (D) anti-rat PRL MAb are shown. Both show MAbs labeled cells throughout the cartilage. No positive reaction was detected in the absence of primary antibodies (A) or by using control mouse IgG₁ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as primary antibodies (C). Scale bar=100 μ m.

Results

The long form of the PRL receptor is expressed in chondrocytes

In order to study whether PRL can act directly on chondrocytes to regulate their survival, we first examined the expression of PRL receptors in articular chondrocytes isolated from normal, postpubescent rat cartilage. The PRL receptor mRNA was investigated by RT-PCR (Fig. 1). Amplification using primers common to all forms of the PRL receptor or specific for the long form of the PRL receptor yielded products having the expected lengths of 582 bp or 1344 bp respectively (Fig. 1B, lanes 4 and 5). These products were similar to the control PCR bands amplified from the rat PRL receptor cDNA (lanes 1 and 2). No product was amplified from chondrocytes when primers specific for the short form of the PRL receptor were used (lane 6). To determine whether the PRL receptor mRNA was translated into protein, PRL receptors were immunoprecipitated from chondrocyte lysates and analyzed by immunoblot (Fig. 1C).

The anti-rat PRL receptor U-5 MAb precipitated a major protein of 85 kDa, the expected size for the long form of the PRL receptor (Okamura *et al.* 1989), and several minor proteins above and below this size. Some of the latter are close to the size estimated for the intermediate (65 kDa) and the short (40 kDa) PRL receptor variants, but additional work is needed to clarify their nature, inasmuch as no short PRL receptor mRNA was detected. In addition, the presence of PRL receptors was examined by immunohistochemistry in sections of femoral heads from adult rats (Fig. 2). Chondrocytes throughout femoral articular cartilage stained positively for PRL receptors as revealed by the anti-rat PRL receptor U-5 and U-6 MAbs (Fig. 2B, D), and no positive labeling was evident in their absence (Fig. 2A) nor with control IgGs of the same isotype (Fig. 2C).

PRL inhibits apoptosis of articular chondrocytes induced by serum deprivation

Next, we determined whether primary chondrocytes isolated from rat postpubescent articular cartilage could be

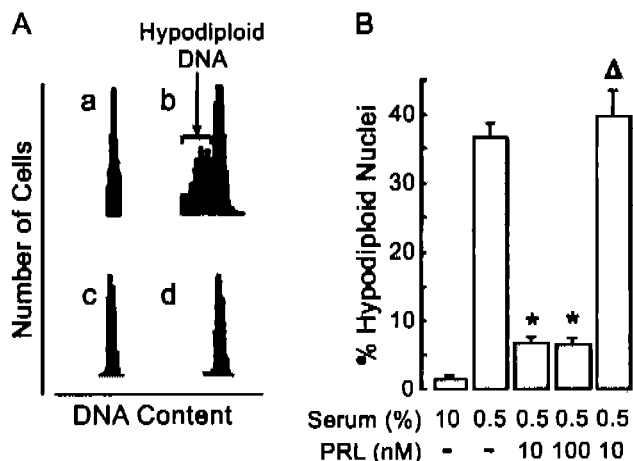


Figure 3 PRL inhibits low-serum-induced apoptosis of articular chondrocytes. (A) Representative experiment in which chondrocytes were cultured for 48 h in medium containing 10% serum (a) or 0.5% serum, either alone (b) or in combination with 10 nM (c) or 100 nM (d) PRL. The cells were then stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Cells containing hypodiploid DNA (apoptotic cells) are indicated. (B) Percentage of cells with hypodiploid DNA from three independent experiments performed as in (A). PRL was used before and after (Δ) heat inactivation for 30 min at 90 °C. Values are means \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs 0.5% serum in the absence of PRL.

induced to undergo apoptosis by the classic signal of serum deprivation. Rat articular chondrocytes were incubated with 0.5% serum, and the amount of apoptosis was measured by propidium iodide staining and fluorescence-activated cell sorting analysis (Fig. 3). This method of flow cytometry quantitates the percentage of cells with hypodiploid DNA occurring because of DNA fragmentation. Incubation in 0.5% serum resulted in a peak of apoptotic cells with DNA hypodiploidy that was absent when cells were cultured in 10% serum. The number of apoptotic cells induced by low-serum corresponded to approximately 35% of total chondrocytes. Coincubation with 10 or 100 nM PRL prevented the appearance of hypodiploid

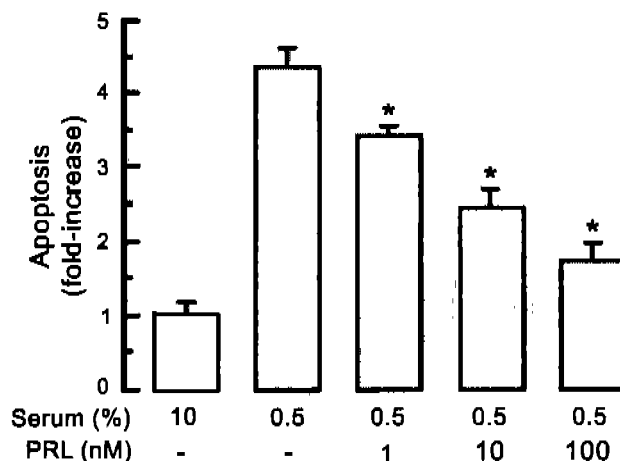


Figure 5 PRL inhibits low-serum-induced apoptosis of articular chondrocytes. Chondrocytes were cultured for 48 h in medium containing 10% serum or 0.5% serum, alone or in combination with different concentrations of PRL. Apoptosis was quantified using an ELISA for nucleosome detection. Results are presented as means \pm S.E.M. of three independent experiments normalized to the amount of apoptosis observed in control chondrocytes cultured in 10% serum. * $P < 0.05$ vs 0.5% serum in the absence of PRL.

cells induced by low-serum. The two PRL concentrations were equally effective, and their protective action was abolished by heat denaturation (Fig. 3B).

PRL protection against apoptosis was confirmed by the detection of DNA strand breaks in cells using the TUNEL method (Fig. 4). Incubation with 0.5% serum increased the number of TUNEL-positive chondrocytes by sixfold compared with cells cultured in 10% serum. The increase in TUNEL-positive chondrocytes was prevented by PRL in a dose-dependent manner (Fig. 4B).

Finally, chondrocyte apoptosis was determined using an ELISA that measures DNA nucleosomal fragments (Fig. 5). Low-serum resulted in a fourfold increase in the amount of apoptosis, and this increase was inhibited by increasing concentrations of PRL.

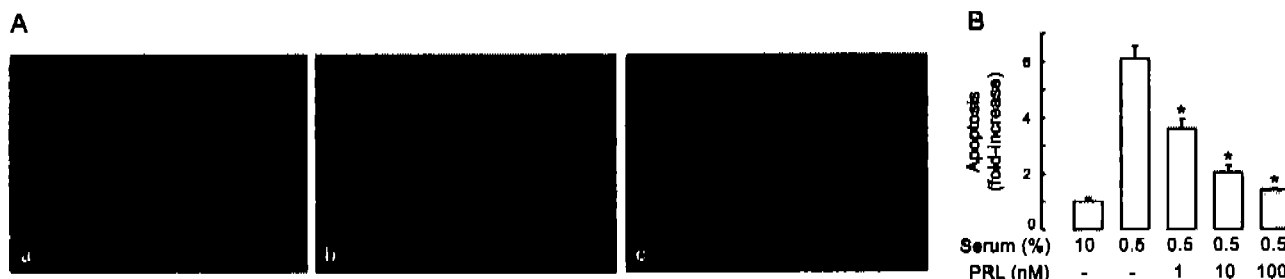


Figure 4 PRL inhibits low-serum-induced apoptosis of articular chondrocytes. (A) Representative experiment in which chondrocytes were cultured on coverslips for 48 h in medium containing 10% serum (a) or 0.5% serum, either alone (b) or in combination with 100 nM PRL (c). TUNEL-positive cells (apoptotic cells) are indicated by bright nuclear fluorescence. (B) Percentage of TUNEL-positive cells from three independent experiments performed as in (A). Six microscopic fields per coverslip were selected at random and visually scanned to record the total number of TUNEL-positive cells relative to those in control cells (incubated with 10% FBS). * $P < 0.05$ vs 0.5% serum in the absence of PRL.

Discussion

Our present study is the first to report that PRL can protect chondrocytes against apoptotic death. Apoptosis was effectively antagonized by PRL. The cellular response to low-serum is compatible with apoptosis, as characterized by flow cytometry quantification of cells with hypodiploid DNA, TUNEL staining, and ELISA measurement of DNA fragments. These three methods identify the degradation of DNA by cleavage between nucleosomes, a hallmark of apoptosis. Consistent with the protective effect of PRL, we also show that chondrocytes express the long form of the PRL receptor mRNA and that this message is translated into significant amounts of protein in the isolated cells and in chondrocytes *in situ*.

The anti-apoptotic effect of PRL was dose related in the TUNEL and ELISA assays. In the flow cytometry assay, the two PRL concentrations tested (10 and 100 nM) were equally potent. The reasons for the same potency are unclear, but might stem from errors in collecting the small amount of light associated with dead cells, which are difficult to spin down by ordinary low-speed centrifugations. The mechanisms underlying the anti-apoptotic effect of PRL in chondrocytes need to be investigated. The survival action of PRL has been associated with the upregulation of Bcl-2, a family of proteins in mouse mammary epithelial cells and in breast cancer cells (Ploszaj *et al.* 1998, Peirce & Chen 2004), and downregulation of Bcl-2 plays an important role in chondrocyte apoptosis induced by serum withdrawal (Feng *et al.* 1998).

The observation that articular chondrocytes from postpubertal rats undergo apoptosis in response to low-serum is in agreement with other *in vitro* studies using 0% serum and chick embryo and adult rat sterna chondrocytes (Ishizaki *et al.* 1994) or adult human and rabbit articular chondrocytes (Feng *et al.* 1998). These findings indicate that, similar to most vertebrate cells, chondrocytes require growth factor signaling for survival. Various hormones and growth factors promote the survival of cultured chondrocytes, including dexamethasone, insulin, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor (TGF)- β and insulin-like growth factor-I (Quarto *et al.* 1992, Ishizaki *et al.* 1994, Gruber *et al.* 2000, Lo & Kim 2004). The present results add PRL to this list and raise the important question of whether PRL is one of the factors regulating the survival of articular chondrocytes *in vivo*.

Articular cartilage is the thin layer of smooth hyaline cartilage that covers the joint surfaces of a bone. Adult articular cartilage is thought to be a postmitotic tissue and because there is virtually no cell turnover, preservation of cell viability is essential for its function (Aigner & Kim 2002). Because cartilage is avascular, serum-borne survival factors must be able to diffuse through the tissue from the synovial fluid of the joint. However, due to the sparse distribution of chondrocytes encased within the extracellular cartilage matrix, an autocrine survival mechanism

may be more efficient, and chondrocytes do produce survival-promoting factors (Ishizaki *et al.* 1994). In this regard, PRL is a component of human synovial fluid (Ogueta *et al.* 2002, Rovensky *et al.* 2005), and may derive from plasma, since most proteins with a molecular mass of less than 100 kDa readily transfer from one fluid space to the other (Perman 1980). In addition, PRL can be generated by chondrocytes. Isolated chondrocytes from rat articular cartilage express PRL mRNA and protein (Macotella *et al.* 2006), and bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells express PRL mRNA during chondrogenic differentiation (Ogueta *et al.* 2002).

Furthermore, chondrocytes express the PRL receptor. PRL receptors have been detected in chondrocytes from cartilage in the diaphysis of digits in newborn rats (Coss *et al.* 2000) and in bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation (Ogueta *et al.* 2002). PRL receptors exist in several isoforms that differ primarily in the sequence and length of the cytoplasmic domain (Bole-Feysot *et al.* 1998). Of interest is the observation that upon chondrogenic differentiation, mesenchymal stem cells switch expression from the intermediate isoform to the long isoform of the PRL receptor (Ogueta *et al.* 2002). In agreement, we show that chondrocytes from postpubertal articular cartilage express the long form of the PRL receptor. Moreover, this receptor isoform is functional in chondrocytes, because PRL stimulates the synthesis of proteoglycans and type II collagen in the chondrocytic mesenchymal cells (Ogueta *et al.* 2002) and protects articular chondrocytes against low-serum-induced apoptosis (present results).

Although chondrocytes respond to PRL *in vitro*, the *in vivo* action of PRL on cartilage function remains to be established. Targeted disruption of the PRL receptor reduces bone development and growth, but this action appears to be independent of a defect in cartilage (Clément-Lacroix *et al.* 1999). Bone alterations were observed mostly in calvaria, where bone formation occurs by intramembranous ossification, and there was no skeletal alteration indicative of a defect of endochondral bone formation. Given that endochondral ossification requires chondrocyte apoptosis, the absence of an endochondral ossification phenotype in these mice would argue against a role for PRL in cartilage survival. While redundant mechanisms could compensate for the loss of PRL action, it is also possible that the anti-apoptotic effect of PRL does not occur in chondrocytes involved in bone development and growth. Articular chondrocytes and cells in prenatal and growth plate cartilage are known to have differences that reflect specific functions and long-term survival (Karsenty & Wagner 2002). For example, unlike other chondrocytes, articular chondrocytes are normally arrested before hypertrophic differentiation leading to apoptosis, allowing cartilage on the articular surface to persist, which is essential for proper joint function.

Multifunctional proteins can exhibit differential effects on chondrocyte subpopulations. For example, TGF- β stimulates chondrogenesis of undifferentiated multipotent mesenchymal cells (Leonard *et al.* 1991), but it blocks hypertrophic differentiation of articular chondrocytes, promoting the survival of articular cartilage (Serra *et al.* 1997). Evaluation of the effect of PRL receptor gene deletion on the aging skeleton or in degenerative joint diseases may provide strong support for the role of PRL as a mediator of articular cartilage survival.

Importantly, loss of adult articular cartilage results from diverse actions including age, loading, and trauma, and it is the major cause of joint dysfunction and disability in rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Goggs *et al.* 2003). Investigations leading to the identification of chondrocyte apoptosis inhibitors should have a major impact on the prevention and treatment of a wide range of disabling rheumatological conditions. Of interest is the fact that PRL has been detected in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Rovensky *et al.* 2005), and that it is expressed by synovial cells in rheumatoid arthritis (Nagafuchi *et al.* 1999). A better understanding of the effect of PRL on chondrocyte survival both *in vivo* and *in vitro* should help elucidate its probable contribution to cartilage function under both healthy and diseased states.

Acknowledgements

We thank Daniel Mondragón, Antonio Prado, Blanca E Reyes Márquez, Pilar Galarza, and Martín García for their expert technical assistance and Dorothy D Pless for editing the manuscript. This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico grant 43401 and by the National Autonomous University of Mexico grant IN202406. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Adams CS & Horton WE 1998 Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anatomical Record* **250** 418–425.
- Aigner T & Kim HA 2002 Apoptosis and cellular vitality. Issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis and Rheumatism* **46** 1986–1996.
- Aigner T & McKenna L 2002 Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59** 5–18.
- Asai-Sato M, Nagashima Y, Miyagi E, Sato K, Ohta I & Vonderhaar BK 2005 Prolactin inhibits apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by serum starvation or cisplatin treatment. *International Journal of Cancer* **115** 539–544.
- Bole-Feyssot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: action, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* **19** 225–268.
- Buckley AR 2001 Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* **10** 684–690.
- Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Arling M, Gaillard-Kelly M, Binart N *et al.* 1999 Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* **140** 96–105.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñas Z, Noris G, Morales MA, Martínez de la Escalera G & Clapp C 2000 Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *Journal of Endocrinology* **166** 53–62.
- Corbacho AM, Martínez de la Escalera G & Clapp C 2002 Roles of prolactin and members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* **173** 219–238.
- Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA & Walker AM 2000 Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **279** E1216–E1225.
- Feng L, Precht P, Balakir R & Horton WE Jr 1998 Evidence of a direct role for Bcl-2 in the regulation of articular chondrocyte apoptosis under the conditions of serum withdrawal and retinoic acid treatment. *Journal of Cellular Biochemistry* **71** 302–309.
- Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M & Mobasheri A 2003 Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Veterinary Journal* **166** 140–158.
- Gruber HE, Norton HJ & Hanley EN Jr 2000 Anti-apoptotic effects of IGF-I and PDGF on human intervertebral disc cells *in vitro*. *Spine* **25** 2153–2157.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S & Lotz M 1998 Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* **41** 1632–1638.
- Hatori M, Klatté KJ, Teixeira CC & Shapiro IM 1995 End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* **10** 1960–1968.
- Ishizaki Y, Burne JF & Raff MC 1994 Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. *Journal of Cell Biology* **126** 1069–1077.
- Karsenty G & Wagner EF 2002 Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell* **2** 389–406.
- Kim HA & Song YW 1999 Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **42** 1528–1537.
- Kouri JB, Rosales-Encina JL, Chaudhuri PP, Luna J & Mena R 1997 Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: a microscopy report. *Journal of Medical Science Research* **25** 245–248.
- Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massague J & Newman SA 1991 Role of transforming growth factor- β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence of endogenous TGF- β -like activity. *Developmental Biology* **145** 99–109.
- Lo MY & Kim HT 2004 Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-I. *Journal of Orthopaedic Research* **22** 140–144.
- Macotela Y, Aguilar M, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G & Clapp C 2006 Matrix metalloproteases from chondrocytes generate antiangiogenic 16 k prolactin. *Journal of Cell Science* **119**.
- Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T & Sakane T 1999 Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **26** 1890–1900.
- Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E & Garcia-Ruiz JP 2002 Prolactin is a component of the human synovial liquid and

- modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **190** 51–63.
- Okamura H, Zachwieja J, Raguet S & Kelly PA 1989 Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology* **124** 2499–2508.
- Peirce SK & Chen WY 2004 Human PRL and its antagonist, hPRL-C129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice. *Oncogene* **23** 1248–1255.
- Pérez E, Luna MJ, Rojas L & Kouri JB 2005 Chondroptosis: an immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis* **10** 1105–1110.
- Perks CM, Keith AJ, Goodhew KL, Savage PB, Winters ZE & Holly JM 2004 Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* **91** 305–311.
- Perman V 1980 Synovial fluid. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, edn 3. Ed J Kaneko. New York, NY, USA: Academic Press Inc.
- Ploszaj T, Moryl T, Orzechowski A, Zimowska W, Wareski P, Skierski J & Zwierzchowski L 1998 Antiapoptotic action of prolactin is associated with up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Apoptosis* **3** 295–304.
- Poole AR 1991 The growth plate: cellular physiology, cartilage assembly and mineralization. In *Cartilage: Molecular Aspects*, pp 179–211. Eds BK Hall & SA Newman. Florida, USA: CRC Press.
- Quarto R, Campanile G, Cancedda R & Dozin B 1992 Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *Journal of Cell Biology* **119** 989–995.
- Roach HI, Aigner T & Kouri JB 2004 Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes. *Apoptosis* **9** 265–277.
- Rovensky J, Imrich R, Radikova Z, Simorova E, Greguska O, Vigas M & Macho L 2005 Peptide hormones and histamine in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocrine Regulations* **39** 1–6.
- Ruffion A, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Eaton CL, Hamdy FC & Dobson PR 2003 The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. *European Urology* **43** 301–308.
- Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R & Moses HL 1997 Expression of a truncated, kinase-defective TGF- β type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Journal of Cell Biology* **139** 541–552.
- Shakibaei M, DeSouza P & Merker HJ 1997 Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biology International* **21** 115–125.
- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y & Gibori G 2001 PRL anti-apoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* **142** 4086–4094.
- Zemmyo M, Komiya S, Kawabata R, Sasaguri Y, Inoue A & Morimatsu M 1996 Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *Journal of Pathology* **180** 430–433.

Received in final form 3 March 2006

Accepted 8 March 2006