



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus UNAM, Juriquilla, Querétaro

MAESTRÍA EN CIENCIAS

(Neurobiología)

TÍTULO DE LA TESIS:

“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA INFLAMACIÓN DE LA
ARTICULACIÓN EN LA ARTRITIS EXPERIMENTAL”

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

LBT. María Guadalupe Ledesma Colunga

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Campus Juriquilla, Oro. Agosto 2012.



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Maria Guadalupe Ledesma Colunga, cuyo título es: "Análisis del efecto de la prolactina sobre la inflamación de la articulación en la artritis experimental" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Ma. Teresa Morales Guzmán

Secretario (Tutor)

Dr. Maria del Carmen Clapp Jiménez Labora

Vocal

Dr. Luz María López Marín

Suplente

Dr. Isabel Cristina Méndez Hernández

Suplente

Dr. Verónica M. Rodríguez Córdova

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

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

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones. Se conoce que la hormona prolactina (PRL) tiene efectos inmunomoduladores y que algunos pacientes con AR presentan hiperprolactinemia. Por otra parte, la lactancia, que se acompaña por altos niveles de PRL en circulación, puede reducir el riesgo y la progresión de AR. En este trabajo se investigó el efecto de la hiperprolactinemia sobre la inflamación de las articulaciones en un modelo de AR inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) en ratas. La administración subcutánea continua de haloperidol, un antagonista de receptores dopaminérgicos tipo D2 que estimula la producción de PRL, fue utilizado para inducir hiperprolactinemia. El tratamiento con haloperidol 3 días antes de la inyección de ACF, contrarrestó el desarrollo de la artritis, evaluada mediante la inflamación, el dolor y la expresión de mediadores pro-inflamatorios (iNOS, TNF- α , IL-1 β , INF- γ , IL-6, MMP-3, MMP-9, MMP-13) en el tobillo y la disminución de peso corporal, que ocurren dentro de los 10 a 21 días después de la inyección de ACF. El haloperidol produjo hiperprolactinemia solamente durante los primeros 14 días después del ACF, sugiriendo que la hiperprolactinemia durante las primeras etapas de la artritis es suficiente para proteger contra la progresión de la enfermedad durante al menos 21 días. Estos hallazgos apoyan el valor protector del haloperidol contra la progresión de la AR. Sin embargo, es necesaria mayor investigación para clarificar los mecanismos de este efecto protector.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by joint inflammation. The hormone prolactin (PRL) exerts immunoregulatory effects, and can be elevated in the circulation of patients with RA. Moreover, breast-feeding, which is accompanied by high circulating PRL levels, can reduce the risk of RA. Here, we investigated the effect of hyperprolactinemia on joint inflammation by using the adjuvant-induced RA model in rats. The subcutaneous placement of tablets containing haloperidol, a dopaminergic D2 antagonist resulting in the pituitary secretion of PRL, was used to induce hyperprolactinemia. Haloperidol treatment initiated 3 days before the injection of complete Freund's adjuvant (CFA) counteracted arthritis development, evaluated by the progressive increase in hind paw swelling, pain, expression of pro-inflammatory mediators (iNOS, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, MMP-3, MMP-9, MMP-13), and the reduction of body weight occurring within 10 to 21 days after CFA injection. Haloperidol produced hyperprolactinemia only during the first 14 days after treatment, suggesting that high levels of circulating PRL during the early stages of CFA-induced arthritis are enough to protect against the progression of the disease for at least 21 days. These findings reveal haloperidol to be a promising therapeutic agent for controlling the progression of RA. Further investigation is needed to clarify the mechanism(s) mediating the protective effect of haloperidol on arthritis progression at different stages of the disease.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Becario No. 53603 y la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Agradezco el apoyo invaluable de las siguientes personas:

- La dirección académica del comité tutorial integrado por las Doctoras: Ma. del Carmen Clapp Jiménez L., Isabel Cristina Méndez Hernández y Rocío Brenda Anguiano Serrano.
- El apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera.
- La asistencia técnica del M. en C. Gabriel Nava Pinto.
- La asistencia de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.
- El apoyo del MVZ. Martín García Servín, responsable del bioterio del Instituto de Neurobiología.
- La asistencia de la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefe de la Unidad de Enseñanza de Estudios de Posgrado.

Cuando un sueño se hace realidad

no siempre se le atribuye al empeño que pongamos en realizarlo.

Detrás de cada sueño siempre hay personas que nos apoyan y que creen en nosotros.

Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos

brindándonos, de diferentes maneras su apoyo, comprensión y solidaridad.

por esto y por todo.....

Gracias

ÍNDICE	pág.
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. Artritis Reumatoide	2
II.1.1 Concepto	2
II.1.2 Epidemiología	3
II.1.3 Etiología	3
II.1.4 Diagnóstico y Tratamiento	5
II.2 Inflamación	7
II.2.1 Generalidades	7
II.2.2 Proceso Inflamatorio	8
II.2.3 Inflamación Aguda y Crónica	9
II.3 Destrucción de la articulación en la AR	10
II.3.1 Estructura de la articulación	10
II.3.1.1 Cápsula articular y membrana sinovial	10
II.3.1.2 Líquido sinovial	11
II.3.1.3 Cartílago articular	12
II.3.2 Inflamación de la articulación	12
II.4 Prolactina (PRL)	14
II.4.1 Prolactina e Inmunomodulación	14
II.4.2 Prolactina, Inflamación y AR	15
II.5. Artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF)	17
II.6. Uso del haloperidol en la rata como modelo de hiperprolactinemia	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	19
V.1 General	19
V.2 Específicos	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VI.1. MATERIALES	20
VI.1.1 Animales	
VI.2 MÉTODOS	20

VI.2.1	Inducción de artritis por el ACF	20
VI.2.2	Tratamiento con haloperidol	20
VI.2.3	Medición de parámetros de inflamación	21
VI.2.3.1	Peso corporal y circunferencia del tobillo	21
VI.2.3.2	Medición de dolor en la articulación del tobillo	21
VI.2.3.3.	Determinación de la expresión de marcadores de inflamación	21
VI.2.3.3.1	Extracción de RNA	21
VI.2.3.3.2	Síntesis de cDNA	22
VI.2.3.3.3	qRT-PCR	22
VI.2.4	Determinación de PRL por radioinmunoanálisis (RIA)	23
VI.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
VII.	RESULTADOS	25
VII.1	Evaluación del efecto protector del haloperidol contra la inflamación en el modelo de AR inducida por ACF	25
VII.1.1	<i>Inflamación del tobillo</i>	25
VII.1.2	<i>Dolor en el tobillo</i>	27
VII.1.3	<i>Peso corporal</i>	27
VII.1.4	<i>Expresión de mediadores de inflamación en la articulación del tobillo</i>	28
VII.2	Efecto del haloperidol sobre los niveles circulantes de PRL	30
VIII.	DISCUSIÓN	31
IX.	CONCLUSIONES	36
X.	REFERENCIAS	37
XI.	ÍNDICE DE TABLAS	45
XII.	ÍNDICE DE FIGURAS	46

I. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune e inflamatoria crónica con una evolución generalmente progresiva que se caracteriza por afectar principalmente a las articulaciones. En la AR, el proceso inflamatorio se centra en la membrana sinovial e involucra la proliferación de células locales, infiltración de células del sistema inmunológico y producción de mediadores de inflamación, en conjunto estos factores promueven la formación del pannus, un tejido inflamatorio hiperplásico que conlleva a la destrucción de la articulación. Se estima que la AR afecta al 1% de la población mundial y que el 75% son mujeres, lo cual sugiere la influencia de hormonas ligadas al sexo en la fisiopatología del padecimiento. Dentro de estas hormonas se encuentra la prolactina (PRL), una hormona adenohipofisaria, que posee efectos sobre el metabolismo, la reproducción y la inmunomodulación. En esta última categoría, el receptor de la PRL se expresa en las células de la articulación (condrocitos y osteoblastos) y en las células del sistema inmune, donde la PRL puede ejercer acciones estimuladoras o inhibitorias sobre la proliferación, la supervivencia y la secreción de mediadores de inflamación. Estas acciones opuestas parecen depender de la concentración de la PRL y de las condiciones del microambiente. La asociación entre la PRL y la AR se apoya en que algunos pacientes con AR cursan con hiperprolactinemia, pero la relación con la actividad del padecimiento no es clara. En este estudio se investigó la influencia de la PRL sobre la progresión de la AR experimental utilizando haloperidol, un antagonista de los receptores D2 a dopamina que incrementa los niveles circulantes de PRL. A continuación se revisan aspectos generales de los antecedentes de este proyecto y se presentan y discuten los resultados obtenidos.

II. ANTECEDENTES

II.1. ARTRITIS REUMATOIDE

II.1.1 Generalidades

La AR es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por inflamación poliarticular, rigidez, dolor y la progresiva destrucción de las articulaciones. Este padecimiento afecta por lo general a las pequeñas articulaciones móviles de las manos y los pies, aunque con frecuencia resultan comprometidas otras articulaciones (Figura 1). El padecimiento ocasiona incapacidad física por la pérdida de movimiento y deformidad de las articulaciones, conllevando lentamente a una disminución de la calidad de vida y muerte prematura debido a inflamación sistémica que puede afectar otros sistemas del cuerpo (Scott y Steer, 2007).

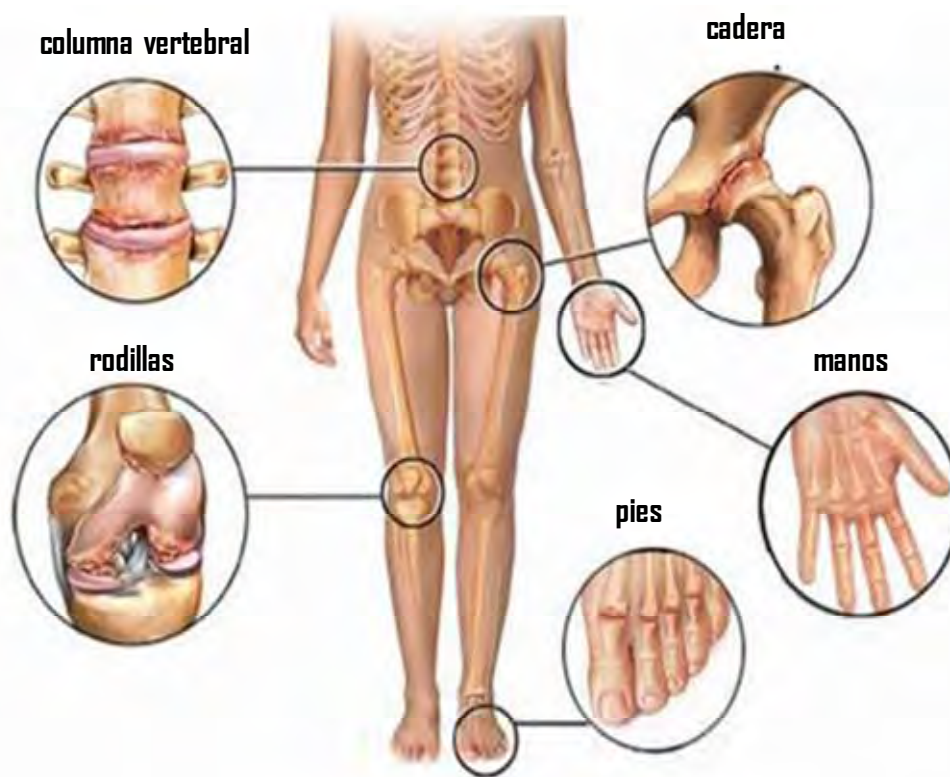


Figura 1. Las articulaciones comúnmente afectadas en la artritis reumatoide. Dentro de ellas se incluyen a las de la columna vertebral, la cadera, las muñecas, los dedos de pies y manos, los tobillos, los codos, los hombros y las rodillas. En estas articulaciones la inflamación local produce deformidad, dolor e inmovilidad (Modificado de Scott y Steer, 2007).

II.1.2 Epidemiología

Se estima que la AR afecta al 1% de la población mundial (Gabriel, 2001). La prevalencia incrementa con la edad, afectando aproximadamente al 8% de personas entre los 18 a los 40 años de edad; al 29% entre los 45 a los 64 años y al 50% de los individuos mayores de 65 años (CDC, 2006). La prevalencia es también significativamente mayor en mujeres que en hombres, en una relación 3:1 (Alamanos y Drosos, 2005).

La incidencia de la AR es relativamente constante en muchas poblaciones. Sin embargo, hay algunas excepciones interesantes. En América del norte y el norte de Europa, se presenta el mayor índice de AR, en un rango de 20 a 50 casos nuevos por 100,000 habitantes en 5 años. En contraste, la incidencia en poblaciones africanas, asiáticas y del sur de Europa es menor, presentándose de 9 a 24 casos nuevos por cada 100,000 habitantes en 5 años. La información concerniente a la incidencia de AR en los países en desarrollo es aún desconocida (Silman y Pearson, 2002).

II.1.3 Etiología

Aunque la etiología de la AR es desconocida, diversos estudios sugieren que se trata de una enfermedad multifactorial, que surge como resultado de la combinación de predisposiciones genéticas específicas, factores ambientales y factores hormonales, que promueven la autoinmunidad (Gabriel, 2001).

En el desarrollo de la AR subyace un fuerte componente genético que supone aproximadamente un 50% de los componentes desencadenantes de la enfermedad (Tobon et al., 2010). La contribución de un componente genético se sustenta en estudios con gemelos univitelinos, en donde se ha demostrado que comparten un 12% el riesgo de desarrollar artritis, mientras que en los gemelos no idénticos el riesgo es menor de 2 a 5% (McCarty y Bundy, 2008).

Dentro de los genes asociados al incremento en la susceptibilidad y severidad de la AR, se encuentran los que codifican para los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por

sus siglas en inglés), proteínas presentes en la membrana celular de células inmunes y otros tipos celulares. Los HLA se encargan de presentar antígenos a los linfocitos T, con lo que intervienen en el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio y a la regulación de la respuesta inmune adaptativa frente a patógenos (Raychaudhuri, 2010). Los genes que codifican para los HLA se localizan en el locus denominado complejo principal de histocompatibilidad (MCH, por sus siglas en inglés) y su expresión genera dos tipos de productos proteicos que se denominan moléculas HLA de clase I y de clase II. En humanos, los HLA de clase II son codificados por tres diferentes *loci*, DR, DQ y DP. En el caso de la AR, la mayor susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad se encuentra en la secuencia DR y parece restringirse a cinco aminoácidos (QKRAA) presentes en la región hipervariable de la proteína resultante (Liao et al., 2009).

Sin embargo, la asociación de las moléculas HLA con la AR solo explica el 40% de la influencia genética. Otro gen asociado con la AR es el que codifica para la tirosina fosfatasa PTPN22, donde algunos polimorfismos ocasionan una insuficiencia para eliminar las células T auto-reactivas durante la selección tímica, predisponiendo de esta forma a la autoinmunidad (Tobon et al., 2010).

En la etiología de la AR se sugiere también la contribución de factores ambientales. Por ejemplo, el incremento en el consumo de cigarrillos conduce a un mayor riesgo de AR. Adicionalmente, se ha reportado que factores como la exposición ocupacional a sílicas y asbestos, la obesidad, y el estrés también podrían conllevar a un incremento del riesgo de AR. Mientras que, una dieta a base de pescado y vegetales, el uso de anticonceptivos orales y el consumo de alcohol, podría disminuir el riesgo de AR (Symmons et al., 1997; Olsson et al., 2000; Oliver y Silman, 2006; Liao et al., 2009).

Asimismo, se ha descrito la asociación de agentes infecciosos al desarrollo de la AR, en virtud de su capacidad de inducir procesos inflamatorios. Dentro de los microorganismos asociados, se encuentran los virus como el Epstein-Barr, el Parvovirus B19, el de la Hepatitis B y de la Rubéola. Además se incluyen las bacterias: *Proteus*

mirabilis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Porphyromonas gingivalis* (Tobon et al., 2010).

La gran prevalencia de la AR en las mujeres sugiere que las hormonas ligadas al sexo podrían estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Esta consideración se apoya en observaciones realizadas en pacientes embarazadas con AR, donde el embarazo produce la remisión de la enfermedad (Silman y Pearson, 2002). Se ha propuesto que la remisión de la AR durante el embarazo sea consecuencia de los altos niveles de estrógenos y progesterona que se conoce ejercen un papel inmunosupresor al inhibir la respuesta inmunitaria ejercida por los linfocitos Th1, que son los principales mediadores de la patogénesis de la AR (van Zeben et al., 1990).

Por otra parte, la influencia de la lactancia sobre la progresión de la AR es controversial. Diversos estudios sugieren, una exacerbación de la enfermedad particularmente durante los tres primeros meses postparto asociada posiblemente a la disminución de los niveles de hormonas esteroides y al incremento en los niveles de la PRL (Brennan y Silman, 1994; Hampl y Papa, 2001). Sin embargo, estudios más recientes muestran que un mayor período de lactancia (> 12 meses) se asocia con una reducción significativa del riesgo de la AR (Karlson et al., 2004; Pikwer et al., 2009).

II.1.4 Diagnóstico y Tratamiento

Generalmente, el diagnóstico de la AR se realiza aproximadamente seis meses después del inicio de la presentación de los síntomas. Los síntomas típicos de los pacientes con AR incluyen inflamación, dolor articular leve, rigidez y fatiga. Se establece que el diagnóstico diferencial de AR requiere de una puntuación ≥ 6.0 en los criterios de evaluación establecidos por el Colegio Americano de Reumatología 2010 (ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) (Funovits et al., 2010) (Tabla 1). El curso de la enfermedad puede variar considerablemente entre los diferentes pacientes. Puede ocurrir una remisión en etapas tempranas o bien el padecimiento puede establecerse y progresar rápida o lentamente (Scott et al., 2010).

Tabla 1. Conjunto de variables y puntuación para el diagnóstico de pacientes con AR (Modificado de Funovits et al., 2010).

Criterio		Puntuación
Compromiso Articular	▪ 1 articulación grande	0
	▪ 2-10 articulaciones grandes	1
	▪ 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes)	2
	▪ 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes)	3
	▪ >10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña)	5
Serología	▪ FR negativo y ACPA negativo	0
	▪ FR débil positivo o ACPA débil positivo	2
	▪ FR fuerte positivo o ACPA fuerte positivo	3
Reactantes de Fase Aguda	▪ PCR Normal y VSG normal	0
	▪ PCR anormal o VSG anormal	1
Duración de los Síntomas	▪ < 6 semanas	0
	▪ ≥ 6 semanas	1

FR: Factor Reumatoide, ACPA: Anticuerpo Anti-proteína Citrulinada, PCR: Proteína C-reactiva, VSG: Velocidad de Sedimentación Globular.

Diversos estudios, enfatizan la importancia de un tratamiento médico intensivo en las primeras etapas de la enfermedad. Aparentemente, intervenciones tempranas parecen marcar una gran diferencia en la evolución de la enfermedad, inclusive en algunos casos se puede reducir o detener su progresión (van der Heide et al., 1996). El tratamiento estándar incluye la administración de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los cuales proporcionan cierto alivio del dolor y la rigidez, pero no mejoran las alteraciones estructurales de la articulación ni la discapacidad física asociada. Ejemplos de AINES comúnmente utilizados son el ibuprofeno y naproxeno (Smolen y Steiner, 2003). La principal desventaja del uso prologando de este tratamiento es que los

pacientes pueden experimentar problemas gastrointestinales. Algunas veces, en las primeras etapas de la enfermedad también se prescriben corticoesteroides, sin embargo su uso es limitado debido a su potente efecto anti-inflamatorio que trae consigo diversos efectos secundarios como infecciones y osteoporosis (O'Dell, 2004).

Una alternativa a los AINES y a los corticoesteroides, es el empleo de fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs) como el metotrexato, la ciclosporina A y leflunomida. De estos inmunosupresores, el más utilizado es el metotrexato. Aunque el tratamiento con FARMEs, detiene o retarda el curso de la AR, se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo es limitado por la pérdida de eficacia y el desarrollo de efectos adversos graves (Emery et al., 2000).

Recientemente, la comprensión de la participación de las citocinas pro-inflamatorias en la fisiopatología de la AR, ha permitido el desarrollo y uso de agentes biológicos dirigidos contra el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; etanercept, infliximab y adalimumab) y la interleucina-1 β (IL-1 β ; anakinra). Además, se han desarrollado terapias prometedoras que bloquean la co-estimulación de las células T (abatacept) y las células B (rituximab). El uso de estos anticuerpos capaces de inactivar moléculas primordiales como el TNF- α y la IL-1 β , producen importantes mejoras en los síntomas y signos de la enfermedad. La mayor desventaja de estos tratamientos es el alto costo que poseen y la variabilidad de la respuesta (Tayar y Suarez-Almazor, 2010).

II.2 INFLAMACIÓN

II.2.1 Generalidades

El término inflamación se refiere fundamentalmente a la reacción de defensa del organismo a la presencia de un estímulo dañino, cuya naturaleza puede ser física, química o bacteriana y que es diseñada para liberar al organismo tanto de la causa inicial de la lesión como de las consecuencias del daño. Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por cuatro signos de respuesta vascular en el área afectada: *calor*, *rubor*, *tumor* y *dolor*. El calor y el rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una extravasación sanguínea en el sitio de la lesión. El tumor se

produce por el edema y cúmulo de células del sistema inmunológico, mientras que el dolor es producido por la presión que ejerce el exudado inflamatorio sobre las terminaciones nerviosas del dolor y depende de la interacción de diversos mediadores químicos entre los que se incluyen la histamina, la serotonina y la bradicidina (Trowbridge y Emling, 1997; Medzhitov, 2010).

II.2.2 Proceso Inflamatorio

La respuesta a la agresión que desencadena un proceso inflamatorio puede dividirse de forma esquemática en tres fases secuenciales: inicialmente en la fase I tiene lugar la liberación de mediadores de inflamación por los mastocitos (Figura 2) que incluyen a la histamina, el factor activador de plaquetas (PAF), enzimas proteolíticas, la heparina y el ácido araquidónico, que a su vez conllevan a la síntesis local de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Estos mediadores promueven la vasodilatación, la permeabilidad vascular e inducen la adhesión leucocitaria al endotelio vascular. Estas acciones resultan en edema y la consecuente extravasación de inmunoglobulinas, factores del complemento y proteínas de fase aguda, entre otras. Además determinan la llegada de células del sistema inmunológico, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos que promueven respuestas del sistema inmunológico específicas y no específicas (Trowbridge y Emling, 1997; Serhan, 2010). En la fase II los macrófagos y linfocitos T activados secretan localmente citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α , el interferon- γ (INF- γ) y la interleucina-6 (IL-6). Las citocinas pasan al torrente sanguíneo, reclutan a más células del sistema inmunológico y estimulan la secreción de pirógenos endógenos que llegan a ocasionar fiebre. En la fase III, esta situación pro-inflamatoria se mantiene hasta resolver la infección o lesión y restablecer la homeostasis (Figura 2). Como la mayor parte de las respuestas inmunitarias, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando, así una respuesta exagerada o perjudicial. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria. Ahora bien, cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos que van a

determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados (Bone, 1996). Sin embargo, en ocasiones, el agente dañino puede persistir y la inflamación tornarse crónica. Así, también es posible que la inflamación crónica se presente como un evento primario, no precedido de inflamación aguda. Tal es el caso de los padecimientos autoinmunes, entre los que se incluye la AR.

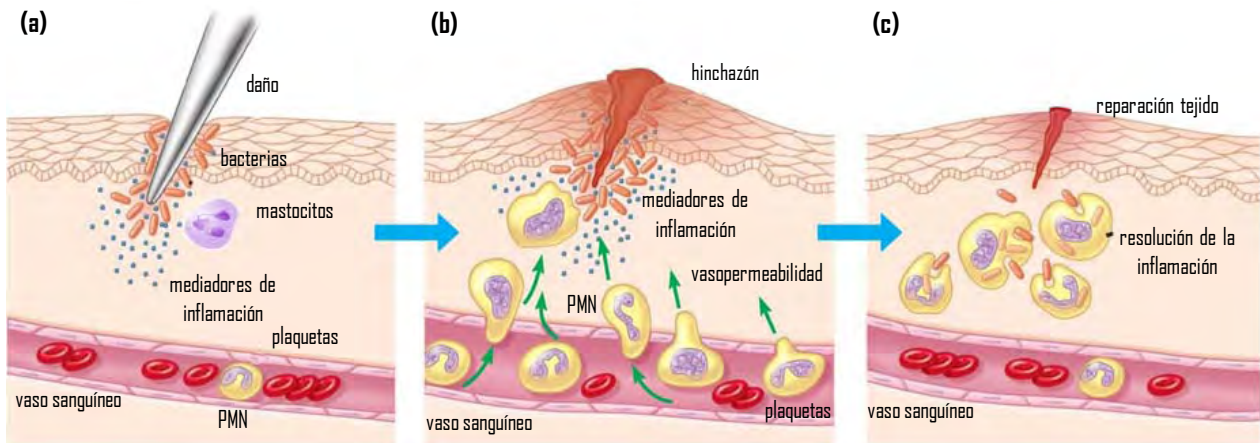


Figura 2. Proceso Inflamatorio. La respuesta a un daño desencadena un proceso inflamatorio que inicia con (a) liberación de mediadores de inflamación que producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen (b) la llegada de moléculas y células inmunes desde la circulación al foco inflamatorio. La respuesta (c) se mantiene hasta resolver la lesión integrando una serie de mecanismos tendentes a finalizar o equilibrar el proceso. Cuando las causas de la agresión desaparecen o son eliminadas, se inician los procesos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados. PMN: células polimorfonucleares. (Modificado de Serhan et al., 2010).

II.2.2 Inflamación Aguda y Crónica

Las reacciones inflamatorias conllevan a la acumulación y activación de células del sistema inmunológico y de proteínas plasmáticas en el foco de infección o lesión que de acuerdo con su duración se definen como agudas o crónicas. La inflamación aguda se refiere a la respuesta abrupta al daño por un período de duración corto (menos de unos cuantos días o semanas). Sin embargo, si el estímulo dañino es persistente, se convierte en una inflamación crónica. La inflamación aguda se caracteriza por un aumento en la vasodilatación, vasopermeabilidad y edema. En el edema, la

extravasación de fluido presenta concentraciones variables de proteínas y células inmunes (frecuentemente neutrófilos). Por su parte, la inflamación crónica se presenta cuando el proceso inflamatorio persiste más de varios días y semanas y se caracteriza por la infiltración de células del sistema inmunológico, principalmente linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, que estimulan la secreción de mediadores de inflamación que perpetúan la respuesta inflamatoria a través de mecanismos que incluyen la estimulación de la proliferación de las propias células inmunes, los fibroblastos y las células endoteliales (angiogénesis) (Trowbridge y Emling, 1997; Serhan, 2010).

II.3 Destrucción de la articulación en la AR

II.3.1 Estructura de la articulación

Una articulación es el área en donde dos o más huesos se unen. Basada en su estructura anatómica, las articulaciones se clasifican comúnmente en: fibrosas, cartilaginosas y sinoviales (Barbe et al., 2009).

Particularmente, las articulaciones sinoviales (Figura 3), son el tipo de articulación más común y están conformadas por los extremos finales de los huesos recubiertos por cartílago hialino. Los dos huesos están unidos por una cápsula de tejido fibroso y separados por una cavidad articular. En su cara interior, la cápsula está recubierta por la membrana sinovial que secreta líquido sinovial el cual lubrica la articulación y nutre al cartílago (Allan, 1998).

II.3.1.1 Cápsula articular y membrana sinovial

La cápsula articular está compuesta por dos capas de tejido conectivo. La capa externa es una membrana fibrosa y consiste de fibras de colágena, esta capa rodea por completo a la cápsula y se adhiere a los huesos adyacentes. Aunque es escasamente vascularizada, esta capa está ampliamente inervada por una gran variedad de fibras somatosensoriales, que median las sensaciones de dolor, propiocepción, presión y vibración. Por otro lado, la capa interna es la membrana sinovial, una estructura altamente vascularizada, con aspecto rosado y uniforme que carece de inervación (Zamorani y Valle, 2007).

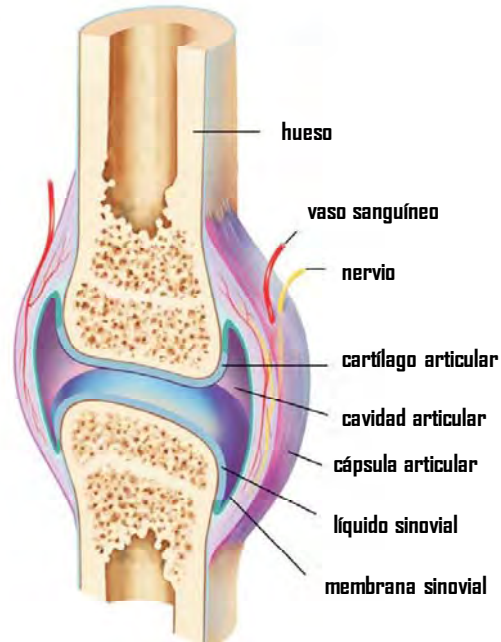


Figura 3. *Anatomía general de las articulaciones sinoviales.* Dibujo esquemático de una vista transversal de la articulación sinovial de la rodilla, se señala cada componente (Modificado de Barbe et al., 2009).

La membrana sinovial comprende de dos a tres capas de células de espesor y está formada por los sinoviocitos que pueden ser de dos tipos e igual proporción: las células de tipo A (macrófagos) y de tipo B (fibroblastos), encargadas de producir y reabsorber el líquido sinovial y de eliminar los desechos de la cavidad articular. Esta membrana carece de células epiteliales, membrana basal y uniones estrechas. En su lugar, se trata de una asociación de células libres en una matriz extracelular, intercaladas por fibras de colágenos y otras proteínas de matriz. La organización porosa de la membrana permite la difusión de nutrientes y probablemente, esta arquitectura favorezca la acumulación de complejos inmunes en la articulación (Breshnihan y Flanagan, 2009).

II.3.1.2 Líquido sinovial

El líquido sinovial, consiste de un fluido formado por ácido hialurónico, lubricina y glicoproteínas. Este fluido viscoso, reduce la fricción entre las superficies articulares y

provee nutrientes para los condrocitos del cartílago articular (Berumen-Nafarrate et al., 2002).

II.3.1.3 Cartílago articular

El cartílago es un tejido avascular y aneural que recibe nutrientes por difusión del líquido sinovial y está compuesto por un solo tipo de células denominadas condrocitos. Estas células producen la matriz extracelular del cartílago constituida por agua, proteínas como la colágena, principalmente la del tipo II y los proteoglicanos (Tatari, 2007). La importancia de este tejido firme y flexible, radica en la función que realiza al soportar las cargas compresivas y evitar el roce de las superficies óseas (Bhosale y Richardson, 2008). Una característica particular del cartílago es que presenta una limitada capacidad de reparación, dada por la baja tasa de proliferación y recambio de los condrocitos (Riesle et al., 1998). Aunado a esto, el sometimiento de las articulaciones a traumas y procesos inflamatorios, también originan daño, reduciendo sus posibilidades de regeneración.

II.3.2 Inflamación de la articulación

La AR, se desencadena por factores desconocidos que inducen el que proteínas propias (auto-antígenos) sean reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico conduciendo a un proceso inflamatorio crónico. El inicio de la presentación de auto-antígenos, llevada a cabo por las células presentadoras de antígeno (CPA) que activan a los linfocitos Th1 ($CD4^+$), tiene lugar en la articulación. Este proceso estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias que inducen la infiltración de células del sistema inmunológico a la cavidad articular (linfocitos T, basófilos, neutrófilos, eosinófilos) y la proliferación de linfocitos B con el consiguiente incremento en la producción de anticuerpos (Firestein, 2003; Goldring, 2003). Además, la membrana sinovial sufre una marcada hiperplasia a partir de células locales (macrófagos, fibroblastos y endotelio vascular), lo que aunado a la infiltración y proliferación de células del sistema inmunológico conlleva a la formación de un frente inflamatorio denominado pannus (Figura 4). El pannus incrementa aún más la producción de citocinas pro-inflamatorias, como el $TNF-\alpha$, la $IL-1\beta$ y el $INF-\gamma$. Diversos estudios han

señalado que la IL-1 β y el TNF- α juegan un papel crítico en la perpetuación y capacidad destructiva del pannus en los pacientes con AR (Brennan et al., 1992; van den Berg y Bresnihan, 1999). Por ejemplo, la sobre-expresión de TNF- α en ratones transgénicos resulta en un cuadro de poliartritis con similitud a la AR (Keffer et al., 1991).

Las citocinas actúan aumentando la síntesis de enzimas proteolíticas (metaloproteasas de matriz (MMP), agrecanasas y proteasas de serina, etc.) (Krane et al., 1990) las cuales promueven la degradación de la matriz extracelular del cartílago y el hueso. Además, las citocinas estimulan la producción de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) que promueve la muerte por apoptosis de los condrocitos articulares (Blanco et al., 1995).

La inflamación junto con el dolor son síntomas iniciales de la AR y son seguidos por varios grados de destrucción de la articulación. En general, el dolor deriva directamente de los procesos inflamatorios que conllevan a la activación de terminales neurales periféricas y su integración a nivel central (Lorton et al., 2008). La inflamación de la articulación genera hiperalgesia, condición en la que se incrementa la sensibilidad a un estímulo, que en ocasiones a pesar de no ser nocivo se percibe como doloroso (Colpaert, 1987).

El sistema nervioso periférico participa tanto en la transmisión nociceptiva como en la estimulación de los procesos inflamatorios. Se ha demostrado la sobre-expresión de neuropéptidos sensoriales, como sustancia P (SP) y calcitonina, en tobillos y ganglios de la raíz dorsal de ratas con artritis inducida por adyuvante (Cambridge y Brain, 1992) y el aumento en los niveles de SP y calcitonina en líquido sinovial de pacientes con AR (Ahmed et al., 2010). Se conoce que estos neuropéptidos incrementan la vasodilatación y el reclutamiento de células del sistema inmunológico al sitio de inflamación (Cambridge y Brain, 1992). Es claro que la identificación de nuevos factores capaces de disminuir la inflamación tiene relevancia en el control de la progresión de la AR. Al respecto, trabajos de nuestro laboratorio sugieren que la hormona PRL es uno de estos factores.

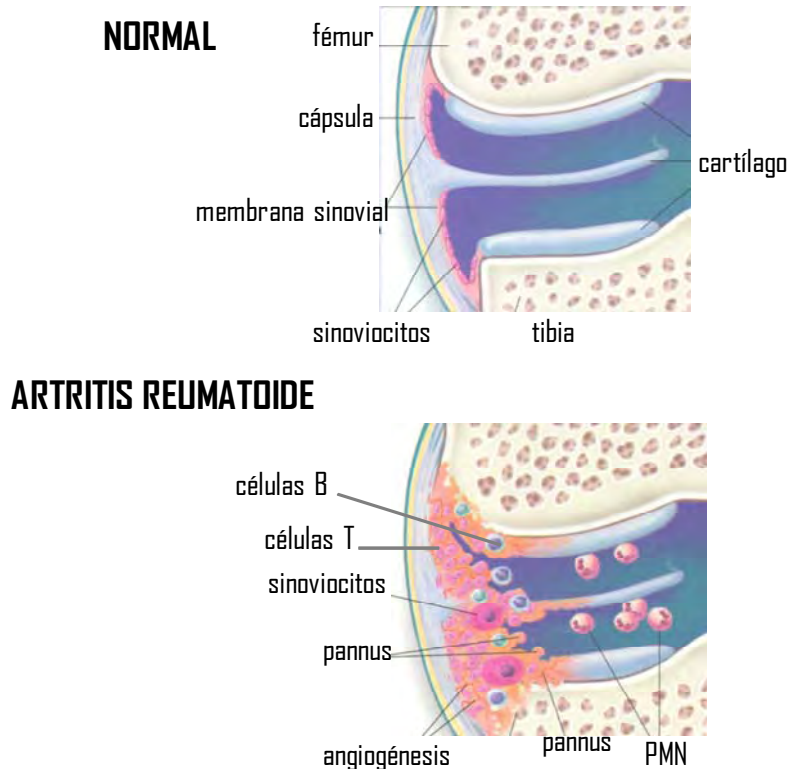


Figura 4. *Proceso inflamatorio en la artritis reumatoide (AR).* Esquema que ilustra el proceso inflamatorio de la articulación que ocurre en el desarrollo de la AR. En la articulación normal, el sinovio consiste de una membrana sinovial (usualmente de dos capas de células de espesor) y tejido conectivo. En la AR, la membrana sinovial se engrosa, por la hiperplasia e hipertrofia de los sinoviocitos y la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que en conjunto con la infiltración y proliferación de linfocitos y células polimorfonucleares (PMN) produce un frente inflamatorio (pannus) que causa la destrucción de la articulación (Modificado de van den Berg y Bresnihan, 1999).

II.4 PRL

II.4.1 PRL e Inmunomodulación

La PRL es una hormona polipeptídica producida por la hipófisis anterior y por múltiples tejidos extra-hipofisarios (Ben-Jonathan et al., 1996), entre los que se encuentra el cartílago (Macotella et al., 2006), la membrana sinovial (Nagafuchi et al., 1999) y las células del sistema inmunológico (Buckley, 2001). La PRL regula una gran variedad de funciones asociadas con la reproducción, la osmoregulación y la inmunomodulación, que afectan la proliferación, diferenciación y supervivencia de diversas células blanco

(Bole-Feysot et al., 1998). El papel inmunomodulador de la PRL fue descubierto en aves y ratones mediante la manipulación *in vivo* de las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Berczi et al., 1981). Estudios subsecuentes demostraron que la PRL promueve la expansión clonal de células T o B, células natural killer (NK) y macrófagos (Matera et al., 1992). Consistentemente, se ha demostrado la expresión del receptor de PRL en todas estas células del sistema inmunológico (Reber, 1993; Yu-Lee, 1997). De hecho, la PRL y su receptor comparten características estructurales y funcionales que ubican a esta hormona dentro de la superfamilia de citocinas hematopoyéticas (que incluye a las interleucinas 2, 3, 4, 6, 7, etc.). Además, la PRL estimula la maduración y supervivencia de los linfocitos T y monocitos, la producción de anticuerpos por los linfocitos B, la secreción de citocinas como TNF- α , INF- γ , IL-2, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Yu-Lee, 1997; Dogusan et al., 2001; Matera et al., 2001) y la adhesión de leucocitos al endotelio vascular necesaria para su extravasación bajo condiciones de inflamación (Montes de Oca et al., 2005).

II.4.2 Prolactina, Inflamación y AR

Todas las acciones enunciadas anteriormente son efectos pro-inflamatorios de la PRL y se tienen evidencias de que ocurren en ciertos órganos. Por ejemplo, se encontró que el tratamiento con PRL promueve la hiperplasia y la inflamación en la próstata (Van Coppenolle et al., 2001). Sin embargo, también, se ha reportado que la PRL puede ejercer efectos anti-inflamatorios. En fibroblastos aislados de pulmón, que son células importantes para los procesos inflamatorios de las vías respiratorias, se mostró que la PRL inhibe la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) inducida en respuesta a una combinación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , INF- γ y TNF- α) (Corbacho et al., 2003). Además, se reportó que, después de generar una respuesta inflamatoria con lipopolisacáridos (LPS), la PRL estimuló la síntesis de IL-10, una citocina anti-inflamatoria (Brand et al., 2004); que la PRL protegió contra la inflamación posterior a un trauma severo reduciendo los niveles de IL-6, una citocina pro-inflamatoria (Zellweger et al., 1996), y que disminuyó la expresión de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β y TNF- α después de un choque hemorrágico (Zhu et al.,

1996). Se ha propuesto que las acciones opuestas de la PRL sobre el proceso inflamatorio pudieran deberse a efectos dependientes de su concentración (Matera, 1996). Por ejemplo, en contraste con la acción promotora de la actividad de las células NK que la PRL ejerce a concentraciones bajas (<25 ng/mL), concentraciones altas muestran una clara actividad inhibitoria sobre el desarrollo, la actividad y la proliferación de las células NK tras su activación por IL-2 (Matera et al., 1992). En este contexto, se conoce que los niveles circulantes de la PRL varían a lo largo del ciclo reproductor de las hembras y que estados de hiperprolactinemia desde moderada hasta aquellos similares a los observados durante la lactancia (>30 ng/mL) pueden tener lugar en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso generalizado (LEG), esclerosis múltiple, AR y artritis psoriásica (Straub et al., 1997; Jacobi et al., 2001; Seriola et al., 2002).

El interés por la posible relación entre trastornos autoinmunes y la PRL se ha reforzado por el hecho de que estos trastornos son más frecuentes en las mujeres que en los hombres (Whitacre, 2001) y los niveles de PRL son más altos en mujeres que en hombres. Sin embargo, el tratamiento con bromocriptina (BRC), un agonista dopaminérgico de los receptores tipo D2 que inhibe la secreción hipofisiaria de PRL, ha sido asociado con mejoría en pacientes con LEG y con AR (Figueroa et al., 1997). Asimismo, estudios clínicos en pacientes con AR no han logrado demostrar una correlación clara entre niveles altos de PRL en la circulación y en el líquido sinovial y la progresión del padecimiento (Orbach y Shoenfeld, 2007). Además, se ha reportado que la lactancia, una condición fisiológica de hiperprolactinemia puede estar asociada directa (Barrett et al., 2000; Hampl y Papa, 2001) o inversamente (Karlson et al., 2004; Pikwer et al., 2009) al inicio y progresión de la AR. De manera que la posible participación de la PRL en la patofisiología de estos padecimientos y, en particular, de la AR no es clara y requiere ser estudiada a mayor profundidad.

Entre los diversos modelos experimentales que han permitido el estudio de los mecanismos que operan en la fisiopatología de la AR, destaca el modelo la artritis inducida por el adyuvante completo de Freund en la rata.

II.5. Artritis Inducida por Adyuvante Completo de Freund (ACF)

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

El método consiste en la inyección intradérmica del ACF que consiste en una emulsión de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor suspendido en aceite mineral y agua. Para este modelo generalmente, se emplean ratas macho de las cepas Wistar, Lewis o Sprague-Dawley (Freund, 1956; Hegen et al., 2008). La exposición sistémica al ACF afecta de forma particular a las articulaciones, observándose signos de inflamación persistente en la articulación del tobillo entre el día 10 y 15 después de la inyección de ACF (Figura 5). Por lo general, la enfermedad es grave y conduce a la permanente malformación de la articulación con características comparables a las de la AR en humanos (Schopf et al., 2006).

El desencadenamiento de la artritis en el modelo de ACF inicia por la introducción de un antígeno de origen bacteriano. Específicamente, se reconocen epítopes de las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) presentes en la superficie bacteriana del *Mycobacterium*, por células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, estos últimos secretan anticuerpos que reaccionan contra los epítopes de las HSP del *Mycobacterium* y que son capaces también de interactuar con las proteínas HSP del hospedero, ocasionando una reacción cruzada. Posteriormente, tiene lugar la expansión de células T autoreactivas y células B, resultando en una respuesta inmune que media la destrucción de la articulación a través de la migración de células del sistema inmunológico hacia la cavidad articular con la subsecuente producción de citocinas pro-inflamatorias por las células activadas predominantemente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ y de auto-anticuerpos. El padecimiento que inicia con el desencadenamiento de un proceso inflamatorio se vuelve crónico, debido en parte a que la articulación es un espacio cerrado que facilita

la acumulación de células del sistema inmunológico y citocinas pro-inflamatorias (Schopf et al., 2006).

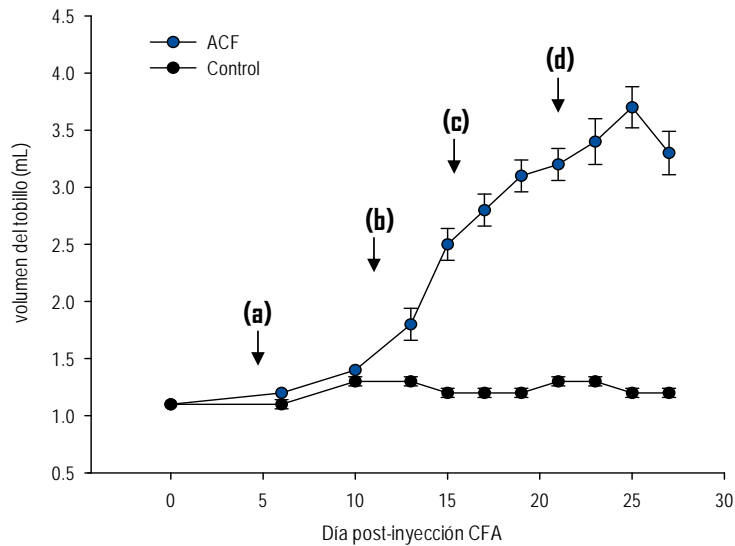


Figura 5. Curso temporal de la progresión del modelo de artritis inducida por ACF. El comienzo de la artritis se indica por signos de inflamación en el tobillos, en el inicio (a) el antígeno se distribuye sistémicamente, depositándose en múltiples sitios incluyendo la articulación, seguida por la generación de mediadores locales de inflamación y (b) reclutamiento de células del sistema inmunológico; posteriormente (c) tiene lugar la formación del pannus que conduce a la (d) degradación severa del hueso y cartílago (Modificado de Schopf et al., 2006).

II.6. Uso del haloperidol en la rata como modelo de hiperprolactinemia

Un modelo experimental ampliamente utilizado para inducir hiperprolactinemia es el tratamiento con haloperidol, un antagonista de los receptores D2 de la dopamina (Mohankumar et al., 1997; de Leeuw van Weenen et al., 2011). Es bien conocido que la secreción adenohipofisaria de PRL está sujeta a un control inhibitorio hipotalámico vía la secreción de dopamina al sistema vascular porta-hipofisario. La dopamina actúa sobre sus receptores D2 presentes en las células adenohipofisarias secretoras de PRL inhibiendo la síntesis y secreción de la hormona. De tal manera que el bloqueo de la inhibición dopaminérgica por medio del haloperidol resulta en niveles elevados de PRL en la circulación (MacLeod y Login, 1976).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica y autoinmune con una evolución progresiva que se caracteriza por afectar principalmente a las articulaciones. Diversas evidencias indican que la PRL está presente en la articulación, que sus niveles pueden incrementarse en asociación con la AR y que esta hormona tiene efectos sobre la inflamación que pudieran influir sobre la progresión del padecimiento. En este trabajo investigamos el efecto del haloperidol, un fármaco que induce hiperprolactinemia, sobre la inflamación de la articulación en el modelo de AR inducida por ACF.

IV. HIPÓTESIS

El haloperidol reduce la inflamación de la articulación inducida por la artritis inducida por ACF en la rata.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Determinar el efecto del haloperidol sobre la inflamación inducida por el ACF en la rata.

V. 2 Específicos

- a) Implementar el modelo de artritis inducida por el ACF.
- b) Administrar haloperidol para inducir hiperprolactinemia en el modelo de artritis inducida por el ACF.
- c) Evaluar el efecto del haloperidol sobre el peso corporal, la circunferencia, el dolor y la expresión de marcadores de inflamación en el tobillo en la artritis inducida por el ACF.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. MATERIALES

VI.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 6 a 7 semanas de edad con un peso corporal promedio de 180-200 g al inicio del experimento, a las cuales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* y se les mantuvo con ciclos de luz-obscuridad de 12:12 h. Los animales se mantuvieron y manipularon de acuerdo con la Guía para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NIH, 1996). Los protocolos experimentales fueron autorizados por el Comité de Bioética de Animales del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales se dividieron aleatoriamente para formar cuatro grupos experimentales: el grupo no tratado (Control), el grupo tratado con haloperidol, el grupo con artritis inducida por ACF y el grupo con artritis inducida por ACF y haloperidol.

VI.2 MÉTODOS

VI.2.1 Inducción de artritis por el ACF

El método consistió en realizar una inyección intradérmica en la parte dorsal de la cola, de 200 µl de ACF (suspensión de aceite mineral con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inactivado por calor) (Difco Laboratories, Detroit, MI) a una concentración final de 10 mg/mL. La inoculación de la suspensión desencadena una respuesta inmunitaria que muestra signos claros de inflamación en los tobillos a partir del día 10 post-inoculación. El número de evaluaciones realizadas en el curso temporal de la enfermedad fueron consideradas en relación con el día de la inducción, que fue designado como día 0. El día 21 post-inmunización los animales fueron sacrificados por decapitación con previa anestesia en una atmósfera saturada de CO₂. Se colectó la sangre y se extrajeron las articulaciones de los tobillos.

VI.2.2 Tratamiento con haloperidol

Los animales fueron anestesiados (70 mg/kg ketamina y 0.3 mg/kg xilacina, i.p.) y mediante una incisión en el dorso se les implantó subcutáneamente una tableta de haloperidol de liberación continua (35 mg, 60 días, Innovative Research of America,

Kansas City, KS). En el grupo con artritis, el implante de haloperidol se realizó 3 días antes de la inmunización con el ACF junto con el grupo tratado únicamente con haloperidol.

VI.2.3 Medición de parámetros de inflamación

VI.2.3.1 Peso corporal y circunferencia del tobillo

El peso corporal y la circunferencia del tobillo se evaluaron cada tercer día durante el período comprendido entre los días 12 y 21 posteriores a la inyección del ACF. La inflamación del tobillo se determinó con un vernier (Lange Caliper, Cambridge Scientific Industries, Cambridge, MA), mediante dos medidas perpendiculares entre sí, para determinar la longitud y la altura de la elipse del cual se determinó la circunferencia. Las medidas se realizaron de lado a lado (a) y de adelante hacia atrás (b) en un ángulo de 45° a través del tobillo calculándose el valor con la siguiente fórmula $2\pi \cdot \sqrt{a^2+b^2}$ (Halloran et al., 1996).

VI.2.3.2 Medición de dolor en la articulación del tobillo

El umbral nociceptivo se cuantificó utilizando un analgesiómetro (Ugo Basile, Milán, Italia) cada tercer día durante el período comprendido entre los días 12 y 21 posteriores a la inyección del ACF. El procedimiento consiste en aplicar un aumento lineal de presión (en gramos) en el dorso de la pata trasera de la rata. El umbral nociceptivo se define como la presión a la cual la rata vocaliza o retira la pata. El límite superior para la administración de presión fue de 250g (Basile et al., 2007).

VI.2.3.3. Determinación de la expresión de marcadores de inflamación

VI.2.3.3.1 Extracción de RNA

Las articulaciones extraídas del tobillo fueron congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Posteriormente, la articulación completa (hueso, cartílago, músculo) se pulverizó en mortero con pistilo, adicionando nitrógeno líquido para disminuir los cambios de temperatura y evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Para extraer el RNA de cada articulación se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El método consistió en la

adición de 1 mL del reactivo a cada 100 mg de tejido inicial, la homogenización vigorosa y la incubación a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Después, se agregó un volumen de cloroformo a razón de 0.2 mL por cada mL de Trizol adicionado, la mezcla se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C, con lo que se distinguieron 3 fases: una fase orgánica (fenol/cloroformo), una interfase y una fase acuosa. El RNA que permanece soluble en la fase acuosa, se recuperó e inmediatamente se le agregó alcohol isopropílico, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12, 000 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado se recuperó, se lavó con etanol al 70% y se sometió una vez más a centrifugación. Se eliminó el exceso de etanol y el pellet precipitado recuperado se diluyó con 50 µL de agua libre de nucleasas. El RNA total aislado se almacenó a -70°C hasta su uso.

VI.2.3.3.2 Síntesis de cDNA

El RNA se retrotranscribió a cDNA utilizando un estuche comercial y las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Brevemente, a 1 µg del RNA se adicionó una mezcla de solución amortiguadora de transcriptasa reversa, la enzima transcriptasa reversa, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y los oligonucleótidos (random primers). Finalmente, a la muestra se le adicionó agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl y se incubó por 2 h a 37 °C. El cDNA obtenido se almacenó a 4°C hasta su uso.

VI.2.3.3.3 qRT-PCR

La cuantificación de la expresión de los genes de interés se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real. El protocolo consistió en preparar una reacción de amplificación agregando: Máxima® SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific Auburn, USA), los oligonucleótidos y el cDNA con volumen final de la reacción de 10 µL. La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador con capacidad para inducir y detectar una señal a 530 nm, siguiendo los parámetros de amplificación previamente estandarizados para cada gen de interés (Tabla 1). El nivel de expresión

se normalizó a la expresión del gen constitutivo, ubiquitina (UBC) (Rioja et al., 2004).

Tabla 2. *Oligonucleótidos.* Secuencias utilizadas para la cuantificación de la expresión de mediadores de inflamación mediante qRT-PCR.

Gen	No. Acceso		Secuencia
<i>IL-1β</i>	NM_031512.2	Forward	5'-AAAAGCGGTTTGTCTTCAAC-3'
		Reverse	5'-GGAATAGTGCAGCCATCTTT-3'
<i>INF-γ</i>	NM_138880.2	Forward	5'-AGCACAAAGCTGTCAATGAA-3'
		Reverse	5'-TTCTTCTTATTGGCACACTC-3'
<i>IL-6</i>	NM_012589.1	Forward	5'-TCCAACTCATCTTGAAAGCA-3'
		Reverse	5'-TTCATATTGCCAGTTCTTCG-3'
<i>TNF-α</i>	NM_013143.1	Forward	5'-GGGCTTGTCACTCGAGTTTT-3'
		Reverse	5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'
<i>MMP-3</i>	NM_133523.2	Forward	5'-GATCTCCTTTGCAGTTGAAG-3'
		Reverse	5'-TGTGACATCATCTGTCCATC-3'
<i>MMP-9</i>	NM_031055.1	Forward	5'-ACTAAGGCTCCTCTTTTGCT-3'
		Reverse	5'-ATTGGTTCGAGTAGCTGGTA-3'
<i>MMP-13</i>	NM_133530.1	Forward	5'-CCTTCTTCTTGTGAGTTGG-3'
		Reverse	5'-ACTGCATTTCTCGGAGTCTA-3'
<i>iNOs</i>	NM_012611.3	Forward	5'-TTTTAGAGACGCTTCTGAGG-3'
		Reverse	5'-GTCCTTTTCTCTTTCAGGT-3'
<i>UBC</i>	NM_017232.2	Forward	5'-CTGACAGGGTGCGGCCATCTT-3'
		Reverse	5'-ACTGCAGCCAACACCGCTGAC-3'

VI.2.9 Determinación de PRL por radioinmunoanálisis (RIA)

De las muestras de sangre se separaron los sueros y se congelaron a -70°C para llevar a cabo la cuantificación de PRL circulante. Los niveles de PRL se determinaron mediante el RIA específico de doble anticuerpo previamente descrito (Hunter y Greenwood, 1962) y de uso rutinario en nuestro laboratorio. Brevemente, la metodología consistió en marcar radioactivamente a la PRL (NIDDK-rPRL-I-5) con ^{125}I mediante el método de Cloramina T. Posteriormente la ^{125}I -PRL se purificó por cromatografía en una columna de filtración en gel (Sephadex G-25) y se cuantificó en un contador de emisiones gamma. Las muestras de suero se incubaron con la ^{125}I -PRL y un anticuerpo específico anti-rPRL generado en conejo (NIDDK-anti-rPRL-RP-9), posteriormente el complejo PRL-anti-PRL se inmunoprecipitó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. La radioactividad del precipitado se cuantificó y se

comparó con la obtenida en presencia de concentraciones variables de una preparación referencia de PRL (NIDDK-rPRL-RP-3), permitiendo expresar los niveles de la PRL endógena en ng/mL. El coeficiente de variación intra e inter-análisis fueron de $\leq 7.0\%$ y $\leq 12.0\%$, respectivamente y la sensibilidad del análisis fue de 1.5 $\mu\text{g/L}$. Para evitar la variación inter-análisis a lo largo de la prueba, se procesaron todas las muestras obtenidas del mismo experimento en el mismo análisis.

VI.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se graficaron como la media \pm el error estándar (EE) y las diferencias entre los grupos se valoraron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) o ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba *post-hoc* de Holm-Sidak. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1 Evaluación del efecto protector del haloperidol contra la inflamación en el modelo de AR inducida por ACF

VII.1.1 Inflamación del tobillo

La inflamación debida a la inoculación del ACF se corroboró mediante el incremento en la circunferencia del tobillo, que fue evidente en el grupo ACF a partir del día 10 post-inoculación y se mantuvo hasta el día 21 posterior a la inducción de la artritis. El tratamiento con el haloperidol previno el aumento en el grosor del tobillo inducida por la inmunización con ACF y no tuvo efecto por sí mismo (Figura 6).

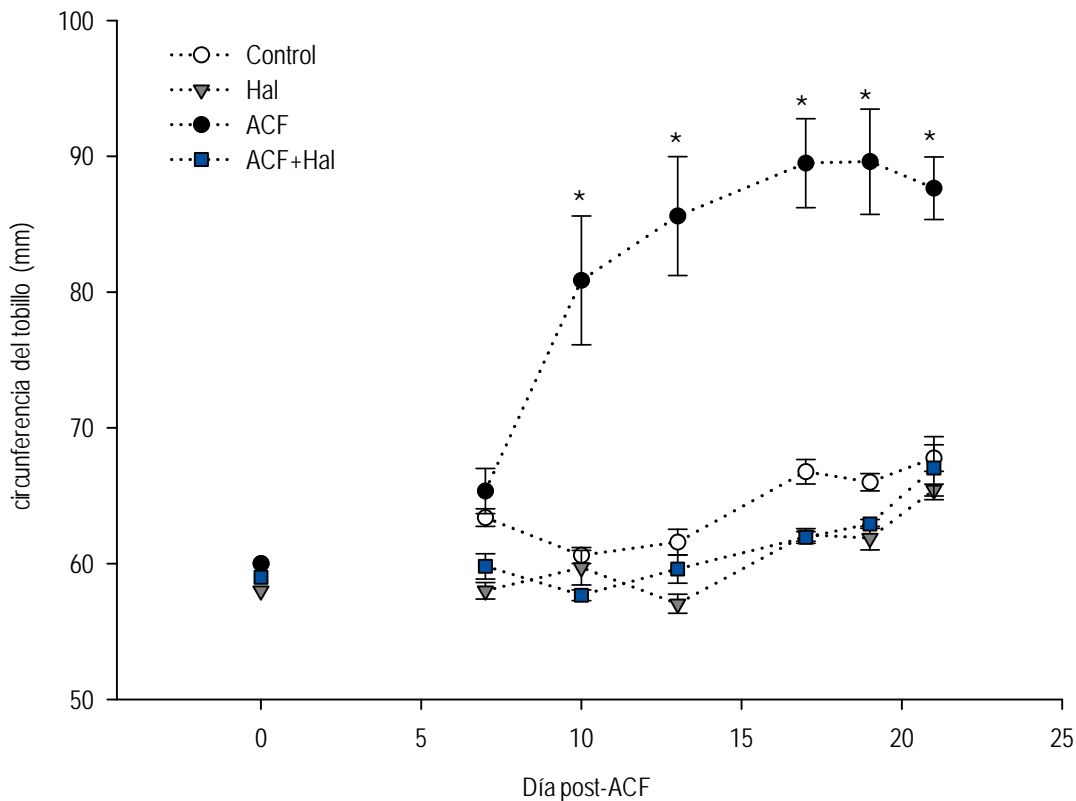


Figura 6. Inflamación inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) en ausencia o presencia de haloperidol (Hal). Se muestra la valoración de la inflamación de las extremidades posteriores, evaluada por la circunferencia del tobillo, y determinada cada 3 días a partir del día 7 y hasta el día 21 después de la inyección del adyuvante completo de Freund (ACF) o del vehículo (Control). Las ratas fueron implantadas subcutáneamente con una tableta de liberación continua de haloperidol 3 días antes de la inmunización con ACF. Los resultados se presentan como la media \pm S.E.M. de 5-8 animales. * $p < 0.001$ vs todos los grupos.

En la Figura 7a se muestran fotos representativas de los tobillos de animales de los cuatro grupos experimentales tomadas a los 21 días después de la inmunización con ACF de los grupos ACF y ACF+Hal. Las diferencias entre los grupos se cuantificaron a través de determinar la circunferencia del tobillo de 5-10 animales diferentes (Figura 7b). El ACF indujo un incremento en el grosor del tobillo que fue estadísticamente significativo y que se previno mediante el pre-tratamiento con haloperidol.

Adicionalmente, los animales del grupo ACF presentaron lesiones extra-articulares, que se manifestaron como nódulos rojos en orejas y la formación de granuloma en el sitio de inyección, estas manifestaciones también fueron prevenidas por el tratamiento con haloperidol (resultados no mostrados).

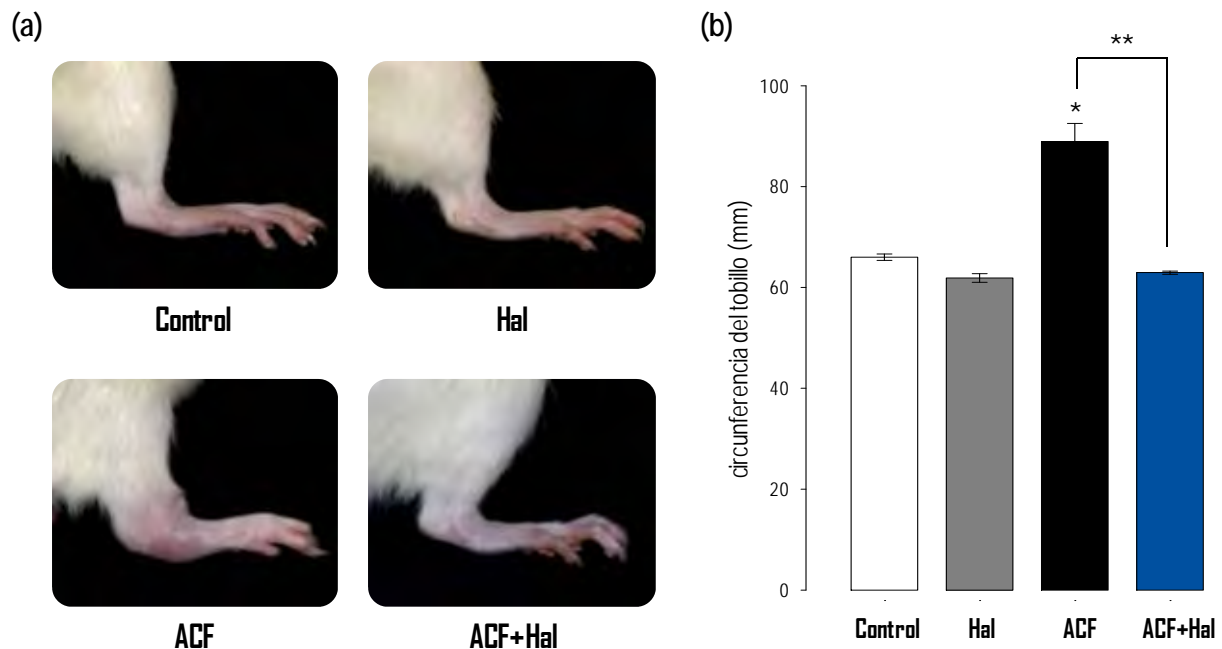


Figura 7. Cuantificación del efecto del haloperidol sobre la inflamación del tobillo. (a) Se muestra un caso representativo de cada grupo de las patas posteriores de las ratas a los 21 días después de la inyección de adyuvante completo de Freund (ACF y ACF+Hal). Los animales recibieron (Hal) o no un implante subcutáneo de una cápsula de liberación continua de haloperidol. (b) Cuantificación de la circunferencia del tobillo, los datos representan la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.001$ vs todos los grupos, ** $p < 0.05$.

VII.1.2 Dolor en el tobillo

La sensibilización de los receptores del dolor es común en la inflamación. Se conoce que el ACF induce una marcada hiperalgesia, por lo que el dolor se evaluó a través del grado de la tolerancia (umbral nociceptivo) a la presión ejercida por un peso aplicado directamente sobre la articulación. Se utilizó un instrumento denominado analgesiómetro que permite registrar el peso aplicado en relación con la respuesta del animal (vocalización y/o retiramiento de la extremidad), denotándose el umbral nociceptivo. Como se esperaba, el grupo inoculado con ACF mostró una reducción en el umbral nociceptivo del tobillo inflamado con respecto al grupo sin ACF. En el grupo tratado con haloperidol se disminuyó parcialmente dicha reducción en el umbral nociceptivo (Figura 8).

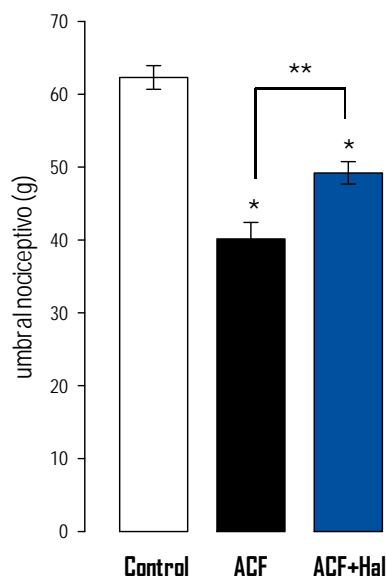


Figura 8. Efecto del haloperidol sobre el umbral al dolor en los animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF). El umbral nociceptivo se registró mediante un analgesiómetro en animales 21 días después de haber sido inoculados (ACF y ACF+Hal) con el ACF. Algunos de los animales fueron implantados subcutáneamente con una tableta de liberación continua haloperidol (Hal). Los resultados representan la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.001$ vs Control, ** $p < 0.05$.

VII.1.3 Peso corporal

Se conoce que la pérdida de peso constituye un parámetro importante de la gravedad de la artritis inducida por ACF. Consistentemente, se encontró que el peso corporal

disminuyó significativamente en el día 21 posterior a la inoculación del ACF con respecto al de los animales no inoculados. La administración del haloperidol atenuó la disminución en el peso en respuesta al ACF (Figura 9).

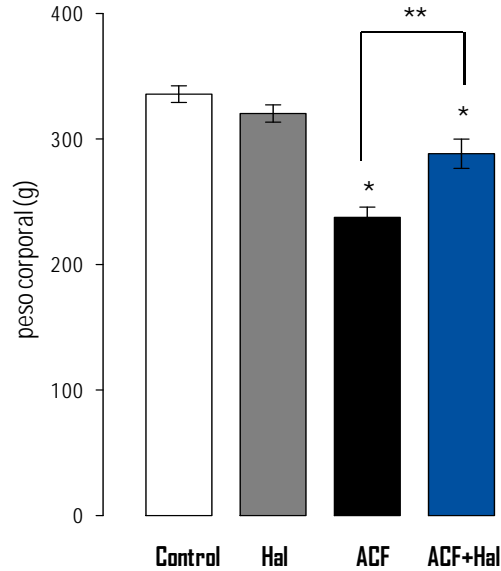


Figura 9. Efecto del haloperidol sobre el peso corporal en los animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF). Se muestra el peso corporal de los animales 21 días después de haber sido inoculados (ACF y ACF+Hal) o no (Control) con el adyuvante completo de Freund (ACF). Los animales recibieron o no un implante subcutáneo de una tableta de liberación continua de haloperidol (Hal). Los resultados representan la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.05$ vs Control, ** $p < 0.01$.

VII.1.4 Expresión de mediadores de inflamación en la articulación del tobillo

Se conoce que la inmunización con ACF desencadena la expresión de mediadores de inflamación entre los que se encuentran las sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), las citocinas pro-inflamatorias, TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-6 y las metaloproteasas de matriz, MMP-3, MMP-9, MMP-13. Los niveles de expresión de estos marcadores se evaluaron en la articulación del tobillo mediante qRT-PCR utilizando como gen de referencia la ubiquitina (UBC). Como se esperaba en respuesta al ACF tuvo lugar un aumento significativo en la expresión articular de la iNOS, el TNF- α , el INF- γ , la IL-1 β , la IL-6, la MMP-3, la MMP-9 y la MMP-13. Notablemente, estos aumentos se redujeron significativamente por el pre-tratamiento con haloperidol (Figura 10).

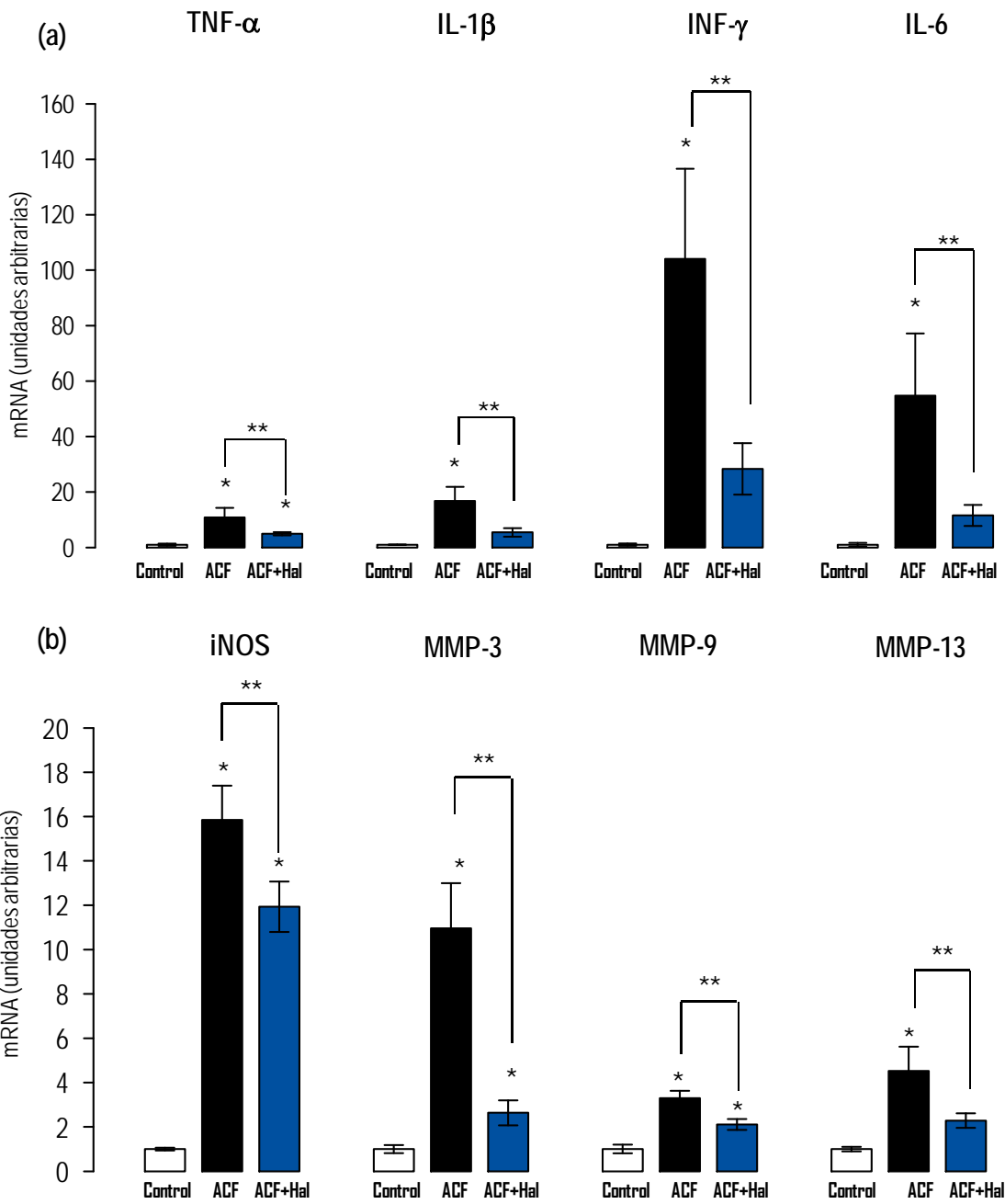


Figura 10. Efecto del haloperidol sobre los niveles de expresión del mRNA de marcadores de inflamación. El nivel de expresión de los marcadores de inflamación se determinó en la articulación de los tobillos de los animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF). La expresión se cuantificó mediante qRT-PCR 21 días después de haber sido inoculados (ACF y ACF + Hal). Algunos animales fueron implantados subcutáneamente con una tableta de liberación continua de haloperidol (Hal). Los resultados representan la media de los valores \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.01$ vs Control, ** $p < 0.05$.

VII.2 Efecto del haloperidol sobre los niveles circulantes de PRL

Para verificar el efecto del haloperidol sobre los niveles circulantes de la PRL, se evaluó la concentración circulante de esta hormona 3 días después del implante de haloperidol, es decir, en el día de la inmunización con el ACF (día 0), y en los días 14 y 21 posteriores al ACF (Figura 11). De acuerdo con lo esperado, el tratamiento con haloperidol incrementó significativamente los niveles circulantes de PRL los días 0 y 14. Sin embargo, en el día 21, el tratamiento con haloperidol no modificó los niveles de la PRL circulante con respecto a los otros grupos experimentales.

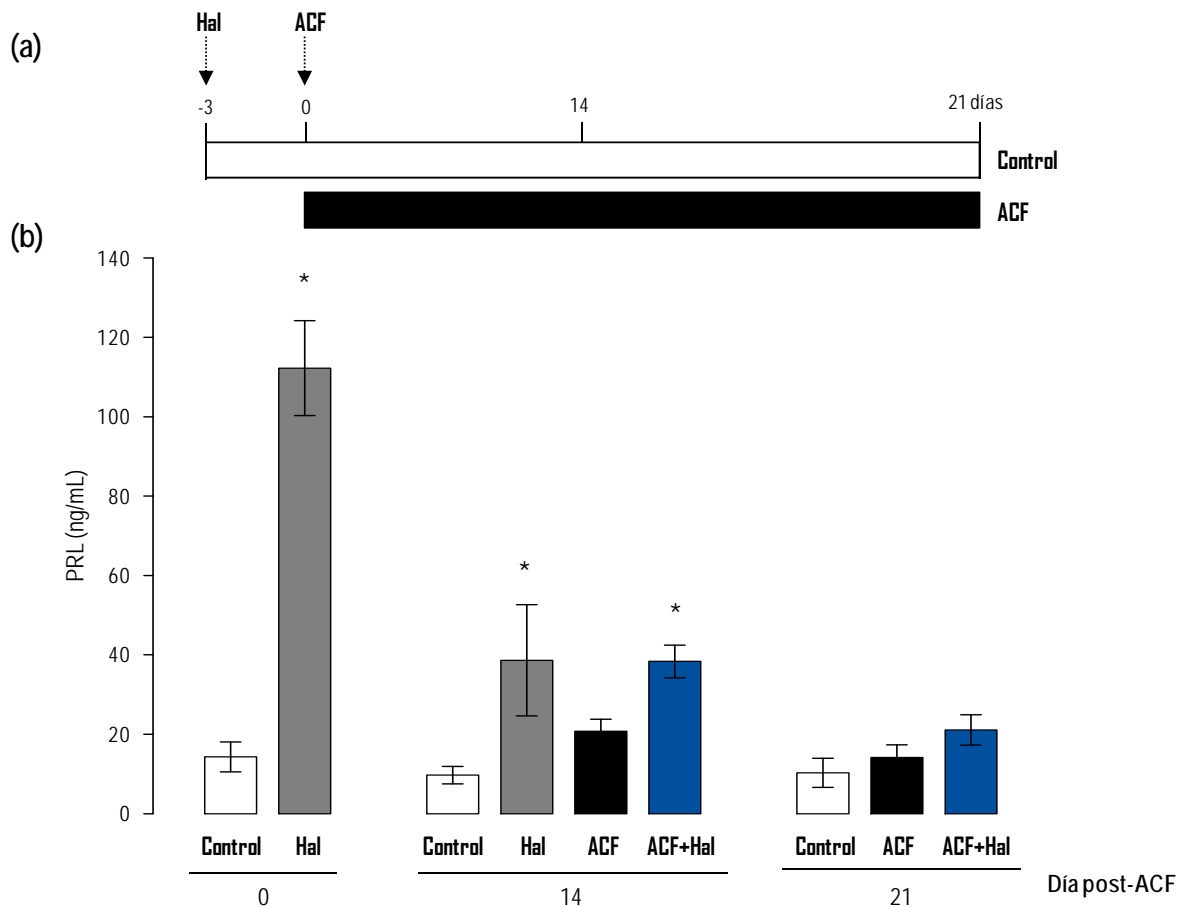


Figura 11. Efecto del haloperidol sobre de los niveles circulantes de la PRL. (a) Diagrama del protocolo utilizado y los días de valoración de los niveles circulantes de la PRL. (b) La concentración de la PRL se determinó en el suero mediante RIA el día de la inoculación con el ACF (día 0) y en los días 14 y 21 posteriores a dicha inoculación. Los animales recibieron o no el implante subcutáneo de una tableta de liberación continua de Hal. Los valores representan la media \pm EE de 5-8 animales. * $p < 0.01$ vs controles sin Hal.

VIII. DISCUSIÓN

La AR es una enfermedad autoinmune, donde se desencadena un proceso inflamatorio crónico que predomina en las articulaciones (Ziff, 1990). A medida que la enfermedad progresa, tienen lugar signos clínicos como el dolor, la inflamación y la rigidez articular. Estos signos resultan de la hiperplasia de células inmunes, de sinoviocitos y de vasos sanguíneos (pannus) en la cavidad articular que, en sus etapas avanzadas, conlleva a la destrucción del cartílago y del hueso. Es por ello que el estudio de factores capaces de contrarrestar la condición inflamatoria tienen potencial terapéutico para lograr un mejor control de la AR (Firestein, 2003).

Hace más de 30 años se reportó el caso de una paciente con AR que cursaba con un cuadro severo de ansiedad por lo que fue tratada de forma prolongada con el fármaco antipsicótico haloperidol y se observó una reducción significativa en los síntomas clínicos de la enfermedad (Grimaldi, 1980). En su momento no se explicó mayormente este efecto. En el presente trabajo de tesis se confirman estos hallazgos dado que el tratamiento crónico por haloperidol tuvo efectos protectores contra la inflamación en un modelo de AR inducido por adyuvante completo de Freund (ACF) en la rata. Los efectos se evaluaron a través de determinar parámetros de inflamación como: el dolor, la circunferencia de la articulación y la expresión de mediadores de inflamación en la articulación del tobillo. Además, se determinaron cambios en el peso corporal total.

El modelo de artritis inducida por ACF en la rata, es un modelo bien caracterizado que comparte características clínicas y pato-fisiológicas con la AR humana. Los animales desarrollan una inflamación crónica poliarticular, que principalmente compromete a las articulaciones de las extremidades posteriores y en particular a las del tobillo, causando inmovilidad, además de la reducción en el peso corporal asociada a la disminución del músculo esquelético y del tejido adiposo. En este modelo, y como ocurre en la AR, la respuesta inflamatoria involucra el reclutamiento de una variedad de células del sistema inmunológico, que incluyen a los linfocitos T y a los macrófagos. Estas células producen citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 que, a su vez, estimulan la producción de otros mediadores de la inflamación, como el NO, citocinas pro-

inflamatorias y MMP (como la 3, la 9 y la 13) y todos estos factores en conjunto promueven la destrucción de los tejidos de la articulación (Escandell et al., 2007; Firestein, 2009).

El papel sustantivo de las citocinas pro-inflamatorias en la AR se apoya en experimentos donde su sobre-expresión, por ejemplo del TNF- α , induce poliartritis (Keffer et al., 1991) y su inmunoneutralización es parte de la terapia actual contra la AR (Geiler et al., 2011). Notablemente, se reconoce que estas citocinas también pueden promover la hipersensibilidad al dolor característica de la articulación inflamada. Por ejemplo, se ha descrito que la inyección local de IL-1 β induce hiperalgesia vía la liberación de mediadores secundarios como las prostaglandinas, NO y bradicinina, mientras que el TNF- α produce hiperalgesia a través de promover la producción local de la IL-1 β (Sommer y Kress, 2004).

Además, las citocinas pro-inflamatorias estimulan el proceso inflamatorio a través de promover la infiltración, proliferación y supervivencia de las células del sistema inmunológico a la cavidad articular (Firestein, 2009). Cabe también mencionar que el NO, producido vía la iNOS, es un mediador muy importante de las acciones destructivas de estas citocinas en la articulación. Por ejemplo, en presencia de oxígeno molecular (O₂), el NO puede formar especies reactivas de óxido nitrogenado que dañan al DNA, inhiben la actividad de diversas enzimas e inician procesos de lipoperoxidación (Grisham et al., 1999). Por ejemplo, se conoce que la estimulación de la expresión de la iNOS y la consecuente producción de NO por las citocinas pro-inflamatorias media sus efectos promotores de la apoptosis de los condrocitos, único tipo celular presente en las articulaciones y por lo tanto, de la degradación del cartílago articular (Lotz, 1999; Presle et al., 1999).

Además, es bien conocido que el cartílago articular está formado fundamentalmente por colágeno de tipo II así como proteoglicanos y agreganos. Estas proteínas son blanco de degradación de varios tipos de proteasas, incluidas las MMP, cuya acción es

clave para la invasión del cartílago por el tejido sinovial. Las citocinas pro-inflamatorias inducen la expresión de estas enzimas por células del pannus, del cartílago y del hueso (Burrage et al., 2006).

Dada la complejidad de todas estas reacciones, es notable el efecto protector del haloperidol observado en este estudio. Este fármaco previno la hinchazón del tobillo, redujo significativamente el dolor y disminuyó la pérdida de peso corporal observada en las etapas finales del cuadro artrítico. Consistentemente, en los animales tratados con haloperidol se redujeron sustantivamente los niveles de todos los marcadores de inflamación analizados en la articulación, a saber: la iNOS, el TNF- α , el INF- γ , la IL-1 β , la IL-6, la MMP-3, la MMP-9 y la MMP-13. Sin embargo, aún se desconoce cuál es el mecanismo que media su efecto y una posibilidad es que involucre a la PRL.

La relación entre PRL y AR ya se ha propuesto previamente y tiene su fundamento en las observaciones de que: (a) la AR es más frecuente en las mujeres que en hombres, (b) algunos pacientes con AR cursan con hiperprolactinemia, y (c) que en el embarazo y la lactancia, caracterizados por hiperprolactinemia se modula la progresión y actividad de la enfermedad. Además, es bien conocido que la PRL forma parte de la superfamilia de citocinas hematopoyéticas y que sus receptores se expresan en la gran mayoría de células del sistema inmunológico. Sin embargo, a pesar de todas estas correlaciones, la influencia de la PRL en la AR es aún controversial. La hiperprolactinemia se ha asociado tanto con la promoción (Barrett et al., 2000; Hampl y Papa, 2001) como con la inhibición (Karlson et al., 2004; Pikwer et al., 2009) del padecimiento. Efectivamente, se conoce que la PRL puede ejercer acciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias dependiendo de su concentración (anti-inflamatoria en concentraciones mayores), del tipo celular y del estado fisiopatológico del organismo (Yu-Lee, 2002).

De relación directa con la posibilidad de que la hiperprolactinemia medie el efecto protector del haloperidol, se ha reportado que la PRL puede inhibir la expresión de la iNOS y la producción de NO inducida por TNF- α , el INF- γ , la IL-1 β (Corbacho et al.,

2003); que la PRL disminuye la producción de IL-6, IL-1 β y TNF- α posterior a un trauma severo (Zellweger et al., 1996; Zhu et al., 1996) y que esta hormona estimula la producción de IL-10, que es anti-inflamatoria, después del tratamiento con LPS (Brand et al., 2004). Además, diversos reportes sugieren que la hiperprolactinemia bloquea la activación de las células NK en condiciones *in vivo* e *in vitro* (Matera et al., 1992).

Estas evidencias indican la capacidad de la PRL de reducir la expresión y acción de citocinas pro-inflamatorias. Dado que estas citocinas son sustantivas en la progresión de la artritis inducida por adyuvante, es posible proponer que en el efecto protector del haloperidol participe la PRL. Sin embargo, si bien durante la fase temprana de la artritis, la protección del haloperidol coincidió con altos niveles de PRL en la circulación, el efecto inductor de hiperprolactinemia del haloperidol tuvo una duración menor a la esperada y en el día 21 los niveles circulantes de la PRL no fueron diferentes a los de los animales no inyectados con el fármaco. De manera que si el mecanismo de acción del haloperidol involucra a la PRL, bastaría con una hiperprolactinemia temprana para prevenir la progresión de la artritis.

También es posible que el efecto protector del haloperidol no incluya a la PRL. Se ha reportado que los linfocitos T, B y NK expresan receptores de dopamina D1 y D2 (Caronti et al., 1998) y en un estudio *in vitro* con leucocitos aislados de sangre periférica se mostró que el tratamiento con haloperidol reduce la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducida por la incubación de los leucocitos con LPS (Moots et al., 1999). Además, se tienen evidencias de que el haloperidol puede regular, si bien a la baja, la ingesta de alimento y la ganancia de peso (von Wilmsdorff et al., 2010). Dada la amplia distribución de los receptores D2 de la dopamina, es factible que este fármaco ejerza su efecto protector contra la artritis experimental a varios niveles.

En resumen, los resultados del presente estudio muestran el valor protector del haloperidol contra la artritis inducida por ACF y apoyan su valor terapéutico en la AR humana. Futuros experimentos deberán investigar la posible contribución de la PRL a este efecto a través de determinar si la administración de esta hormona (mediante

bombas osmóticas de infusión continua) durante los primeros 15 días del padecimiento mimetiza el efecto protector del haloperidol. Asimismo, la inducción de artritis en animales knock-out para el receptor de la PRL (PRLR^{-/-}) podrá clarificar la influencia de esta hormona en la progresión del padecimiento.

IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento con haloperidol previene la hinchazón, atenúa el dolor y la expresión de marcadores de inflamación en la articulación del tobillo, y disminuye la reducción en el peso corporal en el modelo de artritis inducida por ACF.
- Los resultados del presente estudio sugieren que el efecto preventivo de la inflamación por el haloperidol puede ser a través de aumentar las concentraciones de prolactina en la circulación.
- El haloperidol es un agente con potencial terapéutico para el control de la progresión de la AR. Se requiere más investigación para clarificar el mecanismo de su efecto protector.

X. REFERENCIAS

- Ahmed AS, Li J, Ahmed M, Hua L, Yakovleva T, Ossipov MH, Bakalkin G, Stark A. 2010. Attenuation of pain and inflammation in adjuvant-induced arthritis by the proteasome inhibitor MG132. *Arthritis Rheum* 62:2160-9
- Alamanos Y, Drosos AA. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4:130-6
- Allan DA. 1998. Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries. *Clin Orthop Relat Res*:32-8
- Barbe MF, Driban J, Barr AE, Popoff SN, Safadi FF. 2009. Structure and Function Joints. En JS Khurana (Eds.), *Bone Pathology*. (pp. 51-60). New York: Humana Press
- Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman A. 2000. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 43:1010-5
- Basile AS, Janowsky A, Golembiowska K, Kowalska M, Tam E, Benveniste M, Popik P, Nikiforuk A, Krawczyk M, Nowak G, Krieter PA, Lippa AS, Skolnick P, Koustova E. 2007. Characterization of the antinociceptive actions of bicifadine in models of acute, persistent, and chronic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1208-25
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-69
- Bendele A. 2001. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:377-85
- Berczi I, Nagy E, Kovacs K, Horvath E. 1981. Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 98:506-13
- Berumen-Nafarrate E, Leal-Berumen I, Luevano E, Solis FJ, Munoz-Esteves E. 2002. Synovial tissue and synovial fluid. *J Knee Surg* 15:46-8
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. 2010. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62:2192-205
- Bhosale AM, Richardson JB. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87:77-95
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146:75-85

- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19:225-68
- Bone RC. 1996. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 24:163-72
- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J. 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur Cytokine Netw* 15:99-104
- Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. 1992. TNF alpha--a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 31:293-8
- Brennan P, Silman A. 1994. Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:808-13
- Breshnihan B, Flanagan AM. 2009. Synovium. In GS Firestein, RC Budd, T Harris, IB McInnes, S Ruddy, J Sargent (Eds.), *Kelly's Textbook of Rheumatology*. (pp. 23-37). Philadelphia: Saunders Elsevier
- Buckley AR. 2001. Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* 10:684-90
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. 2006. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 11:529-43
- Cambridge H, Brain SD. 1992. Calcitonin gene-related peptide increases blood flow and potentiates plasma protein extravasation in the rat knee joint. *Br J Pharmacol* 106:746-50
- Caronti B, Calderaro C, Passarelli F, Palladini G, Pontieri FE. 1998. Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life Sci* 62:1919-25
- CDC. 2006. Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation--United States, 2003-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55:1089-92
- Colpaert FC. 1987. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain* 28:201-22
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett* 544:171-5
- de Leeuw van Weenen JE, Auvinen HE, Parlevliet ET, Coomans CP, Schroder-van der Elst JP, Meijer OC, Pijl H. 2011. Blocking dopamine D2 receptors by haloperidol

curtails the beneficial impact of calorie restriction on the metabolic phenotype of high-fat diet induced obese mice. *J Neuroendocrinol* 23:158-67

Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, Hooghe-Peters EL. 2001. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol* 120:58-66

Emery P, Breedveld FC, Lemmel EM, Kaltwasser JP, Dawes PT, Gomor B, Van Den Bosch F, Nordstrom D, Bjorneboe O, Dahl R, Horslev-Petersen K, Rodriguez De La Serna A, Molloy M, Tikly M, Oed C, Rosenberg R, Loew-Friedrich I. 2000. A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39:655-65

Escandell JM, Recio MC, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rios JL. 2007. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in lewis rats by suppression of tumor necrosis factor-alpha in T lymphocytes and macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 320:581-90

Figueroa FE, Carrion F, Martinez ME, Rivero S, Mamani I. 1997. Bromocriptine induces immunological changes related to disease parameters in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 36:1022-3

Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-61

Firestein GS. 2009. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. En GS Firestein, RC Budd, T Harris, IB McInnes, S Ruddy, J Sargent (Eds.), *Kelly's Textbook of Rheumatology*. (pp. 1035-86). Philadelphia, PA.: Saunders Elsevier

Freund J. 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*:130-48

Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, Felson D, Hawker G, Hazes JM, Huizinga T, Kay J, Kvien TK, Smolen JS, Symmons D, Tak PP, Silman A. 2010. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Ann Rheum Dis* 69:1589-95

Gabriel SE. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27:269-81

Geiler J, Buch M, McDermott MF. 2011. Anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 17:3141-54

Goldring SR. 2003. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42 Suppl 2:ii11-6

Grimaldi MG. 1980. Serum sulfhydryl levels in rheumatoid patients treated with haloperidol. *Scand J Rheumatol* 9:225-8

- Grisham MB, Jour'd'Heuil D, Wink DA. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315-21
- Halloran MM, Szekanecz Z, Barquin N, Haines GK, Koch AE. 1996. Cellular adhesion molecules in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 39:810-9
- Hampel JS, Papa DJ. 2001. Breastfeeding-related onset, flare, and relapse of rheumatoid arthritis. *Nutr Rev* 59:264-8
- Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, Nickerson-Nutter CL. 2008. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:1505-15
- Hunter WM, Greenwood FC. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-6
- Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, Riemekasten G, Burmester GR, Hiepe F. 2001. Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. *Lupus* 10:554-61
- Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. 2004. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum* 50:3458-67
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025-31
- Krane SM, Conca W, Stephenson ML, Amento EP, Goldring MB. 1990. Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 580:340-54
- Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21:279-83
- Lorton D, Lubahn CL, Zautra AJ, Bellinger DL. 2008. Proinflammatory cytokines and sickness behavior in rheumatic diseases. *Curr Pharm Des* 14:1242-60
- Lotz M. 1999. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25:269-82
- MacLeod RM, Login I. 1976. Control of prolactin secretion by the hypothalamic catecholamines. *Adv Sex Horm Res* 2:211-31
- Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2006. Matrix

metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119:1790-800

Matera L. 1996. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci* 59:599-614

Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. 1992. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 6:409-17

Matera L, Mori M, Galetto A. 2001. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* 10:728-34

McCarty DJ, Bundy EK. 2008. An Overview of Rheumatic Disease Epidemiology. En L Coleman (Eds.), *Nutrition and Rheumatic Disease*. (pp. 39-56). Totowa, NJ: Humana Press

Medzhitov R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140:771-6

Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK, Voogt JL. 1997. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res Bull* 42:435-41

Montes de Oca P, Macotela Y, Nava G, Lopez-Barrera F, de la Escalera GM, Clapp C. 2005. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Lab Invest* 85:633-42

Moots RJ, Al-Saffar Z, Hutchinson D, Golding SP, Young SP, Bacon PA, McLaughlin PJ. 1999. Old drug, new tricks: haloperidol inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 58:585-7

Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. 1999. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26:1890-900

NIH. 1996. National Institute of Health. *Guía para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Washington D. C.: National Academy Press

O'Dell JR. 2004. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2591-602

Oliver JE, Silman AJ. 2006. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 35:169-74

Olsson AR, Skogh T, Wingren G. 2000. Occupational determinants for rheumatoid arthritis. *Scand J Work Environ Health* 26:243-9

Orbach H, Shoenfeld Y. 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 6:537-42

- Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. 2009. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68:526-30
- Presle N, Cicolletta C, Jouzeau JY, Abid A, Netter P, Terlain B. 1999. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1beta in rats. *Arthritis Rheum* 42:2094-102
- Raychaudhuri S. 2010. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22:109-18
- Reber PM. 1993. Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 95:637-44
- Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1998. Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. *J Cell Biochem* 71:313-27
- Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. 2004. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137:65-73
- Scott DL, Steer S. 2007. The course of established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21:943-67
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376:1094-108
- Schopf LR, Anderson K, Jaffee BD. 2006. Rat models of arthritis: Similarities, differences, advantages, and disadvantages in the identification of novel therapeutics. In CA Stevenson, LA Marshall, D Morgan (Eds.), *In Vivo Models of Inflammation*. (pp. 1-34). Boston: Birkhäuser
- Serhan CN, Ward, Peter A., Gilroy, Derek W. 2010. *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press
- Seriolo B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. 2002. Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966:258-62
- Silman AJ, Pearson JE. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S265-72
- Smolen JS, Steiner G. 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2:473-88
- Sommer C, Kress M. 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 361:184-7

- Straub RH, Zeuner M, Lock G, Scholmerich J, Lang B. 1997. High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 36:426-32
- Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, Silman AJ. 1997. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 40:1955-61
- Tatari H. 2007. [The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair]. *Acta Orthop Traumatol Turc* 41 Suppl 2:1-5
- Tayar JH, Suarez-Almazor ME. 2010. New understanding and approaches to treatment in rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 94:201-14
- Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. 2010. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 9:A288-92
- Trowbridge HO, Emling RC. 1997. *Inflammation: A Review of the Process*. Illinois: Quintessence Books
- Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, Legrand G, Dewailly E, Fournier S, Cousse H, Authie D, Raynaud JP, Beauvillain JC, Dupouy JP, Prevarskaya N. 2001. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E120-9
- van den Berg WB, Bresnihan B. 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 13:577-97
- van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, Haanen HC, Hofman DM, van Albada-Kuipers GA, ter Borg EJ, Brus HL, Dinant HJ, Kruize AA, Schenk Y. 1996. The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 124:699-707
- van Zeben D, Hazes JM, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA, Cats A. 1990. Diminished incidence of severe rheumatoid arthritis associated with oral contraceptive use. *Arthritis Rheum* 33:1462-5
- von Wilmsdorff M, Bouvier ML, Henning U, Schmitt A, Gaebel W. 2010. The impact of antipsychotic drugs on food intake and body weight and on leptin levels in blood and hypothalamic ob-r leptin receptor expression in wistar rats. *Clinics (Sao Paulo)* 65:885-94
- Whitacre CC. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2:777-80

- Yu-Lee LY. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215:35-52
- Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 57:435-55
- Zamorani MP, Valle M. 2007. Bone and Joint. En S Bianchi, C Martinoli (Eds.), *Ultrasound of the Musculoskeletal System*. New York: Springer
- Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. 1996. Prolactin: a novel and safe immunomodulating hormone for the treatment of immunodepression following severe hemorrhage. *J Surg Res* 63:53-8
- Zhu XH, Zellweger R, Ayala A, Chaudry IH. 1996. Prolactin inhibits the increased cytokine gene expression in Kupffer cells following haemorrhage. *Cytokine* 8:134-40
- Ziff M. 1990. Rheumatoid arthritis--its present and future. *J Rheumatol* 17:127-33

XI. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Conjunto de variables y puntuación para el diagnóstico de pacientes con AR.</i>	6
Tabla 2	<i>Oligonucleótidos.</i>	23

XII. INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Las articulaciones comúnmente afectadas en la artritis reumatoide.</i>	2
Figura 2.	<i>Proceso Inflamatorio.</i>	9
Figura 3	<i>Anatomía general de las articulaciones sinoviales.</i>	11
Figura 4.	<i>Proceso inflamatorio en la artritis reumatoide (AR).</i>	14
Figura 5.	<i>Curso temporal de la progresión del modelo de artritis inducida por ACF.</i>	18
Figura 6.	<i>Inflamación inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) en ausencia y presencia de haloperidol.</i>	25
Figura 7.	<i>Cuantificación del efecto del haloperidol sobre la inflamación del tobillo.</i>	26
Figura 8.	<i>Efecto del haloperidol sobre el umbral al dolor en los animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF).</i>	27
Figura 9.	<i>Efecto del haloperidol sobre el peso corporal en los animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF).</i>	28
Figura 10.	<i>Efecto del haloperidol sobre de los niveles de expresión del mRNA de marcadores de inflamación.</i>	29
Figura 11.	<i>Efecto del haloperidol sobre los niveles circulantes de PRL.</i>	30