



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación del efecto de la vasoinhibina sobre la
producción de óxido nítrico en sinoviocitos tipo
fibroblasto en cultivo.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA:

OSCAR FERNANDO MARTÍNEZ DÍAZ

TUTORES

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA., UNAM.

M.C MARÍA GEORGINA ORTIZ ARBALLO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA., UNAM.

M.C JOSÉ FERNANDO GARCÍA RODRIGO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA., UNAM.

Cuautitlán Izcalli., Estado de México., 2021



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

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Evaluación del efecto de la vasoinhibina sobre la producción de óxido nítrico en sinoviocitos tipo fibroblasto en cultivo

Que presenta el pasante: **Oscar Fernando Martínez Díaz**
Con número de cuenta: **417036290** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.</u>	
VOCAL	<u>M.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q. Karla Paola Hernández Pérez</u>	
2do. SUPLENTE	<u>L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Evaluación del efecto de la vasoinhibina sobre la producción de óxido nítrico en sinoviocitos tipo fibroblasto en cultivo

Que presenta el pasante: **Oscar Fernando Martínez Díaz**

Con número de cuenta: **417036290** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.</u>	_____
VOCAL	<u>M.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	_____
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q. Karla Paola Hernández Pérez</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Evaluación del efecto de la vasoinhibina sobre la producción de óxido nítrico en sinoviocitos tipo fibroblasto en cultivo

Que presenta el pasante: **Oscar Fernando Martínez Díaz**

Con número de cuenta: **417036290** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.</u>	_____
VOCAL	<u>M.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	_____
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>Q. Karla Paola Hernández Pérez</u>	
2do. SUPLENTE	<u>L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Evaluación del efecto de la vasoinhibina sobre la producción de óxido nítrico en sinoviocitos tipo fibroblasto en cultivo

Que presenta el pasante: **Oscar Fernando Martínez Díaz**

Con número de cuenta: **417036290** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.</u>	_____
VOCAL	<u>M.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	_____
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>Q. Karla Paola Hernández Pérez</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez</u>	<u>Trejo Rodríguez Miguel A.</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



Para mis padres, hermanos y México.



Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla Querétaro, Qro., bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L, de la M. C. Georgina Ortiz Arballo y del M.C. José Fernando García Rodrigo con el financiamiento de CONACYT (A-S1-9620) y DGAPA-PAPIIT UNAM (IN200518 y IN202321).

Agradezco el apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera, la Dra. Xarubet Ruíz Herrera, el MVZ. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León.



Agradecimientos

Agradezco a mi Dios por ser que por ser la partícula energética necesaria para dar continuidad a este sistema al cual llamamos universo, nuestro objeto de estudio.

Agradezco a mi casa mater, la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una diversidad de oportunidades académicas y personales. Comprendo que el formar parte de esta casa de estudios es sinónimo de orgullo y de satisfacción, sin embargo, este hecho también representa el compromiso de velar por los ideales de libertad, igualdad, solidaridad, y progreso a favor de presentes y futuras generaciones universitarias y de México.

Gracias a mis padres, María Leonor Rosalía Díaz Araiza y Jorge Antonio Martínez Ortiz, pilares en mi vida. A pesar de sentirse en la incertidumbre ante mi bienestar, seguridad y la viabilidad de mis proyectos me han brindado su apoyo incondicional a tal grado de hacer su día a día el sacrificio. Comprendo que su presencia en mi vida no está a la medida de la cantidad de kilómetros, pues en momentos difíciles me alentaron, ante mis proyectos que parecían ser descabellados me aconsejaron, ante mi inquietante necesidad de salir, descubrir y sentir este mundo me apoyaron, a mi retorno a casa, como si volviera a nacer siempre me recibieron con una sonrisa y los brazos abiertos. Por esto y muchas cosas más, gracias. No hay palabras ni cantidad de éxitos dedicados a ustedes con los que logre equiparar todo lo que me han dado, de tal manera que todo pequeño o grande éxito en mí vida estará dedicado a ustedes en agradecimiento. Los amare por siempre.

A mis hermanos, Jorge Martínez Díaz y Andrea Alejandra Martínez Díaz; durante mi preparación universitaria hemos estado ausentes físicamente, pero en todo momento su afecto y presencia han persistido en mi mente. Jorge, mi mente evoca continuamente el recuerdo en el que cuando éramos pequeños te solías desvelar trabajando con tu soldadura, alambres de cobre, focos leds, circuitos, y cautín (aún tengo presente ese aroma a soldadura que infestaba la habitación) con el fin de tener un impecable trabajo; ahora las cosas han cambiado, pues te encuentro sumergido en tu computadora haciendo diseños de máquinas, robots, o en otro estado dirigiendo la instalación de tus creaciones, con base a ello, y tal vez sin querer, me has enseñado que con paciencia, perseverancia y trabajo es posible consolidar nuestros proyectos personales. Mi persona favorita, mi amada hermana Andrea te confieso que desde el día que llegaste a casa has iluminado nuestras vidas con tus risas, afecto, energía y espontaneidad. Pequeña, gracias por ser amiga, hermana, apoyo, la perfecta pareja de baile, y fuente de chismes. Me pesa saber que has sacrificado



mucho por mí cuando nosotros como hermanos mayores no deberíamos someterte a estos contratiempos, pero ten en mente que también lucharé y apoyaré por la continuidad de tus proyectos. Nunca dudes lo grande que eres y puedes ser; siempre sigue aquello que te apasione en la vida. Por tanto, a mis hermanos que tanto amo y me orgullecen les doy gracias infinitas por el gran apoyo que me han brindado durante este tiempo.

Desde aquella noche de febrero que salí de casa para aventurarme al centro del país con el objetivo de lograr uno de mis grandes metas, he recibido en innumerables y constantes ocasiones el apoyo de diversas personas. A todas y todos, gracias por creer en mí, en especial la familia González Díaz, específicamente a mis tíos Crescencio y Ma. de los Ángeles, mis primas Mildred y Maritza que sin pensarlo dos veces me abrieron las puertas de su hogar y me brindaron su apoyo incondicional. A la familia Zepeda Díaz y Martínez Gutiérrez es especial a mi prima Ma. de Lourdes y mi tía Patricia, ya que con sumo esfuerzo velaron por mis proyectos haciéndolos posibles.

Inesperadamente un día del otoño austral nos conocimos y desde ese día hemos compartido tanto de nosotros. Mi querida mejor amiga Juana Valentina Rey Lodoño te agradezco rotundamente tus palabras de aliento en los momentos difíciles, de tu apoyo, por establecer en mí el gusto por la fotografía, por inspirarme a seguir descubriendo este mundo, por abrirme las puertas de tu hogar. Me has enseñado a disfrutar esos detalles que solía pasar por alto y redescubrir mi entorno. Eres la mejor compañera de viaje, gracias por las aventuras que hemos vivido y que hoy evocamos con nostalgia, pero también con suma alegría. He aprendido muchas cosas de ti y deseo profundamente que en un futuro logremos compartir innumerables onces donde recordemos las aventuras que nos esperan. Te quiero y extraño.

Durante mi estancia universitaria, lejos de casa y a través del tiempo comprendí que familia también son aquellas personas con las que compartes día a día una parte de tu persona en tiempo y espacio. A Vanessa Reséndiz, Jahir Hereiva, Aurora Valdez, Rubí Sánchez, Tonanztin Escalante, José Galicia y, Alan Rosales, mi pequeña familia. Juntos cosechamos y compartimos éxitos académicos, festejamos con una mesa repleta de alimentos, conversamos de nuestros sentimientos, nos apoyamos en situaciones difíciles, por todas esas risas y locuras, gracias. Sin ustedes mi estancia universitaria sería tan gris. Les quiero y siempre les llevaré en mi mente.



Agradezco a la doctora Carmen Clapp Jiménez L. que desde el primer día me ha abierto las puertas de su laboratorio y me ha brindado de su apoyo para hacer posible mi estancia en su laboratorio. A mis coasesores, la M.C. Georgina Ortiz Arballo y el M.C. José Fernando García Rodrigo que han sido como mis papás en el laboratorio; gracias por lo que me han compartido, enseñado y apoyado. Gina muchas gracias por todo lo que me has compartido, por tu tiempo y siempre atenta a los detalles de mi tesis. José, muchas gracias por tus consejos en los momentos difíciles, por los desayunos que se han convertido en una competencia gastronómica entre chilaquiles y postres.

Al coordinador y profesor el L.F Miguel Ángel Trejo le agradezco de su apoyo y sus consejos durante mi estancia en la facultad. Reitero que usted representa una de las personas que me apoyaron para llegar a Querétaro y conocer a mis actuales asesores.

Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser casa y centro de enseñanza. Gracias a todos mis profesores quienes me han compartido sus conocimientos y experiencias para consolidarme como un profesionista farmacéutico, en especial a la profesora Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga, la Doc. Raquel López Arellano, al Doc. Raúl Sampieri Cabrera, y al Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García. A la Universidad Austral de Chile, que representa una parte personal y académica importante en mi formación universitaria, en especial a la Doc. Carolina Manosalva y la Doc. Karín Jürgens S. quienes me compartieron su pasión por la toxicología y farmacognosia; a la Doc. Daniella Carreta y el Doc. Rafael Burgos por aceptarme en su laboratorio de farmacología veterinaria para hacer una estancia de investigación y enseñarme nuevas técnicas.

A mis queridas chiquillas, Louise Klerlein, Sol Vaquera, Florencia Apud, Juana Rey y mis amigos Blahienko Vrsalovic, Pablo Oyarzún y Constanza Pérez. Gracias por esas risas compartidas, por esos carretes en Bimba, onces, por su amistad. A pesar de la distancia les llevo en mi mente, no hay día que no desee verlos de nuevo para seguir construyendo nuevas aventuras inmersos de una espesa neblina, bajo la infinita lluvia o cobijados con el calor de la chimenea.



Índice

Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Artritis reumatoide.....	3
2.1.1. Sinoviocitos tipo fibroblasto.....	5
2.1.2. Mediadores proinflamatorios.....	7
2.2. El óxido nítrico.....	7
2.2.1. Implicación del óxido nítrico en la artritis reumatoide.....	8
2.3. La prolactina.....	8
2.3.1. La prolactina en la artritis reumatoide.....	9
2.4. La vasoinhibina.....	10
2.4.1. La vasoinhibina y la inflamación.....	11
III. Justificación.....	13
IV. Hipótesis.....	14



V.	Objetivos.....	14
	5.1. Objetivo General:.....	14
	5.2. Objetivos Específicos:	14
VI.	Metodología.....	15
	6.1. Diagrama organizacional	15
	6.2. Electroforesis y azul de Coomassie	17
	6.3. Animales	17
	6.4. Extracción de sinoviocitos tipo fibroblasto (STF)	17
	6.5. Conteo celular con la cámara de Neubauer y estacionamiento de las células	18
	6.6. Caracterización de los cultivos de STF	19
	6.7. Expresión de la iNOS.....	19
	6.7.1. Extracción de ARN	19
	6.7.2. Síntesis de ADNc	20
	6.7.3. qRT-PCR	20
	6.8. Western blot.....	20
	6.9. Cuantificación de óxido nítrico mediante la reacción de Griess	21
	6.10. Análisis estadístico.....	21
VII.	Resultados.....	22



7.1.	La vasoinhibina recombinante tiene un peso molecular aparente de 16kDa y una concentración de 153.62 ng/ μ L.	22
7.2.	Los cultivos celulares están enriquecidos de sinoviocitos tipo fibroblasto.	23
7.3.	La vasoinhibina induce la expresión génica de la iNOS.....	24
7.4.	La vasoinhibina aumenta los niveles de la proteína iNOS.	25
7.5.	La vasoinhibina aumenta la concentración de óxido nítrico.	26
VIII.	Discusión	27
IX.	Conclusión.....	31
X.	Referencias	32
XII.	Índice de figuras	48
XIII.	Índice de tablas	48



Abreviaturas

AR	Artritis reumatoide
AI	Artropatías inflamatorias
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina 6
MMP's	Metaloproteasas de matriz
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
PRL	Prolactina
STM	Sinoviocitos tipo macrófago
STF	Sinoviocitos tipo fibroblasto
Vi	Vasoinhibina
°C	Grados Celsius
h	Hora(s)
kDa	Kilo Dalton
mc	Micras
μg	Microgramos
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
rpm	Revoluciones por minuto
°T	Temperatura ambiente
V	Voltios



Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria progresiva autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones móviles. En la etiología de la AR participan factores genéticos y ambientales que conducen al reclutamiento de células inmunes a la cavidad articular y a la activación de células residentes (sinoviocitos). La activación de los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) resulta en la producción de citocinas proinflamatorias, enzimas proteolíticas y de mediadores inflamatorios entre los que destaca el óxido nítrico (NO), un radical libre que al ser producido por la sintasa inducible de NO (iNOS) contribuye a la inflamación y destrucción de los tejidos de la articulación. La hormona prolactina (PRL) reduce la inflamación en la artritis experimental, si bien se le han atribuido efectos tanto inhibidores como estimuladores de la inflamación en la artritis reumatoide. La PRL podría promover la inflamación articular a través de su procesamiento proteolítico a vaso inhibina, un fragmento de la PRL que estimula la producción de NO en fibroblastos de pulmón determinantes de la inflamación en vías respiratorias. En este estudio, evaluamos el efecto de la vaso inhibina sobre la expresión de la iNOS y la producción de NO en STF aislados de la articulación sinovial del ratón. Los cultivos primarios de STF se incubaron en ausencia y presencia de diferentes concentraciones (10, 50, 100 nM) de vaso inhibina recombinante. La expresión del ARNm y de la proteína iNOS se evaluaron mediante qRT-PCR y Western blot, respectivamente. El NO, se determinó mediante la reacción de Griess que cuantifica sus metabolitos estables (nitritos y nitratos). Los resultados mostraron que la vaso inhibina induce la expresión de la iNOS y la producción de NO de forma dosis dependiente. Concluimos que la vaso inhibina puede promover la inflamación articular a través de inducir la producción de NO en los STF. Por lo tanto, proponemos que la conversión proteolítica a vaso inhibina podría contribuir a explicar las acciones controversiales de la prolactina en la artritis reumatoide.



I. Introducción

Las artritis inflamatorias comprenden un grupo de padecimientos que afectan las articulaciones móviles, la columna vertebral y otras estructuras corporales [1]. Dentro de las artritis inflamatorias, destaca por su prevalencia mundial (1%) y en México (1.6%) [2, 3], la artritis reumatoide (AR), una enfermedad inflamatoria progresiva autoinmune con efectos articulares y sistémicos. La etiología de la AR es multifactorial, pero se considera que una combinación de factores tanto genéticos como ambientales la desencadenan a través de generar una respuesta inmune aberrante que conlleva a la infiltración de células inmunes a la cavidad articular y a la proliferación de células locales (sinoviocitos), que resulta en el desarrollo de un frente invasivo denominado “pannus” el cual destruye el cartílago y el hueso [4, 5]. Estos eventos son mediados por factores proinflamatorios como las citocinas proinflamatorias (Cit: interleucina 1beta (IL-1 β), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gamma (IFN γ), entre otras) [6] y el óxido nítrico (NO) [7]. El NO es un gas que ejerce diversas funciones incluyendo la relajación del músculo liso y la regulación de la respuesta inmune que tiene un papel importante en la fisiopatología de la AR. Los niveles del NO se asocian con la severidad de la AR [8] y el tratamiento con inhibidores de las sintasas de óxido nítrico (NOS) reduce la inflamación articular en modelos de artritis inflamatoria [7, 9]. Por lo tanto, el estudio de factores reguladores de la producción de NO son de interés clínico. Uno de estos factores es la hormona prolactina (PRL).

La PRL es ampliamente reconocida por sus efectos estimuladores de la producción de leche en la lactancia, pero es una hormona multifuncional a la cual se le han atribuido acciones sobre los tejidos de la articulación [4]. Se conoce que la PRL promueve la supervivencia del cartílago y reduce la producción de citocinas proinflamatorias en la artritis inflamatoria experimental [10, 11]. Sin embargo, la PRL también puede tener acciones proinflamatorias a través de su conversión proteolítica a vasoinhibina, un fragmento de PRL que activa la producción de NO en las vías respiratorias. Estudios realizados en fibroblastos de pulmón en cultivo, muestran que la vasoinhibina induce la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la producción de NO con una potencia similar a la combinación de las Cit [12]. Además, la vasoinhibina promueve la translocación nuclear del factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B), responsable de inducir la transcripción de la iNOS [13]. Sin embargo, el efecto de la vasoinhibina sobre la producción de NO por células de la articulación no ha sido evaluado. En el presente estudio, pretendemos investigar si la vasoinhibina induce la expresión del ARNm y proteína de la iNOS, así como



la producción de NO en cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblasto aislados de la articulación del ratón.



II. Antecedentes

2.1. Artritis reumatoide

Las articulaciones sinoviales o móviles se encuentran constituidas por huesos revestidos por cartílago, lubricadas por el líquido sinovial y contenidas en una cápsula tapizada por la membrana sinovial. Esta organización estructural permite una amplia gama de movimientos bajo condiciones normales [14] que se pierde bajo condiciones de inflamación (artritis inflamatoria) causando dolor y rigidez [15].

Las artritis inflamatorias o artropatías inflamatorias (AI) son un grupo de trastornos caracterizados por dolor e inflamación articular [1]. Se han descrito más de 100 tipos de AI y se considera que este grupo de padecimientos es la principal causa de pérdida de movimiento y discapacidad en el mundo [16]. Dentro de estas patologías, destaca por su prevalencia mundial (1%) y en México (1.6%) [2, 3] la artritis reumatoide (AR), una enfermedad inflamatoria progresiva autoinmune con efectos articulares y sistémicos, que conlleva a la destrucción del cartílago y el hueso [4].

La etiología de la AR es multifactorial, pero se considera que una combinación de factores tanto genéticos, como ambientales la desencadenan a través de generar una respuesta inmune aberrante, que da como resultado al reclutamiento de células inmunes (células T & B autorreactivas) a la cavidad articular y la sobreproducción de factores proinflamatorios en la articulación como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) [17], las catepsinas [18], citocinas proinflamatorias como la interleucina 1beta (IL-1 β), la interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) [19] y otros mediadores proinflamatorios entre los que destacan el óxido nítrico (NO) [8]. Estos factores promueven la infiltración de células inmunes, la proliferación de células sinoviales residentes (sinovitis) y la formación local de vasos sanguíneos (angiogénesis) propiciando la formación de un tejido invasivo denominado “pannus” que degrada al cartílago y al hueso [20].

Se ha evidenciado que los factores genéticos tienen influencia en el desarrollo de la AR al mostrar que gemelos monocigóticos tienen una predisposición del 50% para presentar esta patología [21, 22]. Además, hay una asociación directa entre la AR y el complejo mayor histocompatibilidad tipo II (MCH-II), donde la expresión de la cadena beta de dicho complejo (DRB1) está directamente relacionada con la sobreproducción del factor reumatoide (FR) y los anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPA) [23] características de pacientes que cursan con AR.



Los factores ambientales también son determinantes en la AR, por ejemplo, el estrés crónico puede favorecer una respuesta inflamatoria articular [24-26]. El sexo también ejerce influencia en la aparición de esta patología. Se ha reportado que las mujeres son más susceptibles a presentar AR frente a los hombres en una relación 3:1 [27]. Otros factores como el tipo de dieta [28, 29], las enfermedades infecciosas y la microbiota oral e intestinal [30, 31], si bien difieren en su mecanismo de acción, tienen en común la generación de proteínas citrulinadas, las cuales son reconocidas como antígenos por el organismo, generando una respuesta autoinmune [32].

Es importante destacar que los factores ambientales y propios del huésped son dinámicos, pues al expresarse en conjunto aumentan la probabilidad de desarrollar esta patología. Por ejemplo, en pacientes fumadores que son ACPA positivos, el riesgo de desarrollar AR aumenta 21 veces en comparación con los no fumadores [33].

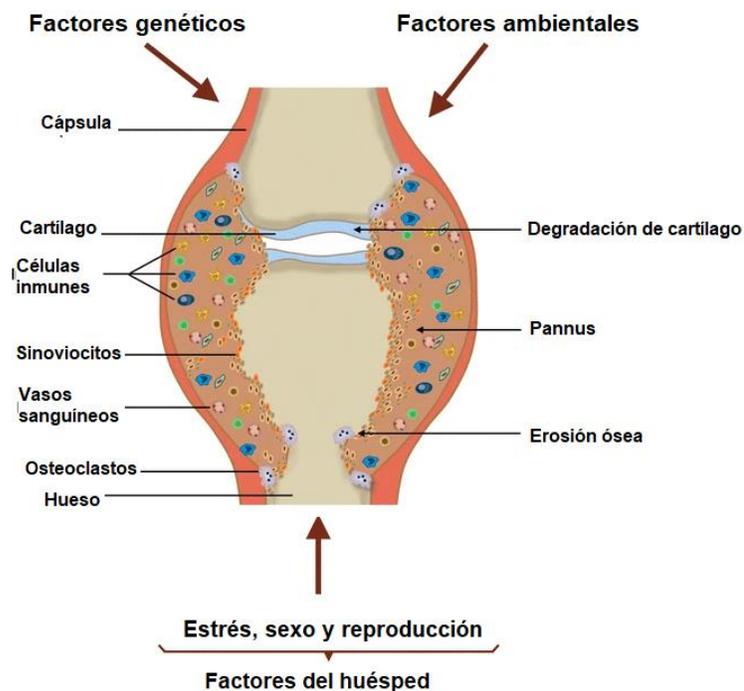


Figura 1. Representación gráfica de una articulación afectada por la AR. Una combinación de factores genéticos, ambientales y del huésped (estrés, sexo y la reproducción) influyen en el reclutamiento de células inmunitarias y la proliferación de células sinoviales, que junto con la formación de vasos sanguíneos locales (angiogénesis), mantienen la proliferación de un “pannus” invasivo que promueve la degradación del cartilago y la erosión ósea. Modificado de Clapp C., *et al.*, 2016.



2.1.1. Sinoviocitos tipo fibroblasto

La membrana sinovial es el principal componente de la articulación que origina el proceso inflamatorio en la AR, transformándose de un tejido sano de dos a tres células quiescentes de grosor a uno hiperplásico e invasivo infiltrado de células inmunocompetentes.

La membrana sinovial se divide en dos compartimentos anatómicos: la capa de revestimiento articular y la capa más íntima en contacto con la cavidad intra-articular. Esta última, produce líquido sinovial y se compone de dos tipos celulares: las células sinoviales A o tipo macrófago (STM) que provienen de la médula ósea y corresponden al 20% de las células de la capa íntima sinovial; y los sinoviocitos B o tipo fibroblasto (STF) que comprenden su mayor porcentaje (80%) [14, 34]. Los STF juegan un papel protagónico en los procesos inflamatorios de la articulación.

Los STF sintetizan lubricina y ácido hialurónico que son componentes fundamentales del líquido sinovial necesarios para lubricar y nutrir al cartílago avascular [35]. Este tipo celular expresa marcadores característicos de fibroblastos (colágeno tipo IV y V, vimentina y CD90 [36]); sin embargo difiere de fibroblastos no-sinoviales en su expresión selectiva de proteínas como la cadherina-1 [37], la uridina difosfoglucosa deshidrogenasa (UDPGD) [36], la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) [38] y el factor acelerador del decaimiento (CD55) [39] que bajo condiciones de inflamación se sobreexpresan para promover el proceso inflamatorio articular.

Los STF se activan en un entorno proinflamatorio produciendo mediadores inflamatorios como la IL-1 β , TNF α , IL-6, NO, MMP, entre muchos otros (Tabla 1) [35]. Además, este tipo celular expresa una amplia variedad de factores de crecimiento y moléculas de superficie como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- α y β), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), la ICAM-1 y VCAM-1, entre muchas otras. Los STF también secretan moléculas quimioatrayentes (quimiocinas como CXCL5, CXCL10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, etc., [14]), las cuales reclutan células inmunes a la cavidad articular. Estos procesos establecen una red paracrina / autocrina que perpetua la sinovitis, contribuyendo a la formación del “pannus” el cual a su vez propicia la destrucción de la matriz extracelular del cartílago y la erosión del hueso [11, 14, 36, 40-42].

Función	Moléculas efectoras
Angiogénesis	IL-8, TGF-beta, PDGF, GM-CSF, G-CSF, FGF, VEGF, EGF
Quimiocinas	IL-8, IL-16, MCP-1, MIP-alfa



Proinflamatoria	IL-8, IL-16, IL-7, IL-11, IL-15, LIF, PDGF, MIF, GM-CSF, TRX, iNOS
Osteoclastogenesis	RANKL, VEGF
Degradación de matriz	PGE, colagenasa, gelatinasa, catepsinas, estromelisin, agrecanasa, MMP

Tabla 1. Moléculas efectoras producidas por los STF. EGF: factor de crecimiento epidermal; FGF: factor de crecimiento de fibroblasto; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL: interleucina; LIF: factor inhibidor de leucemia; MIF: factor inhibidor de macrófagos; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; RANKL: ligando del receptor activador NF κ B; TRX: tioredoxina; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. Modificado de Ritchlin C., 2000.

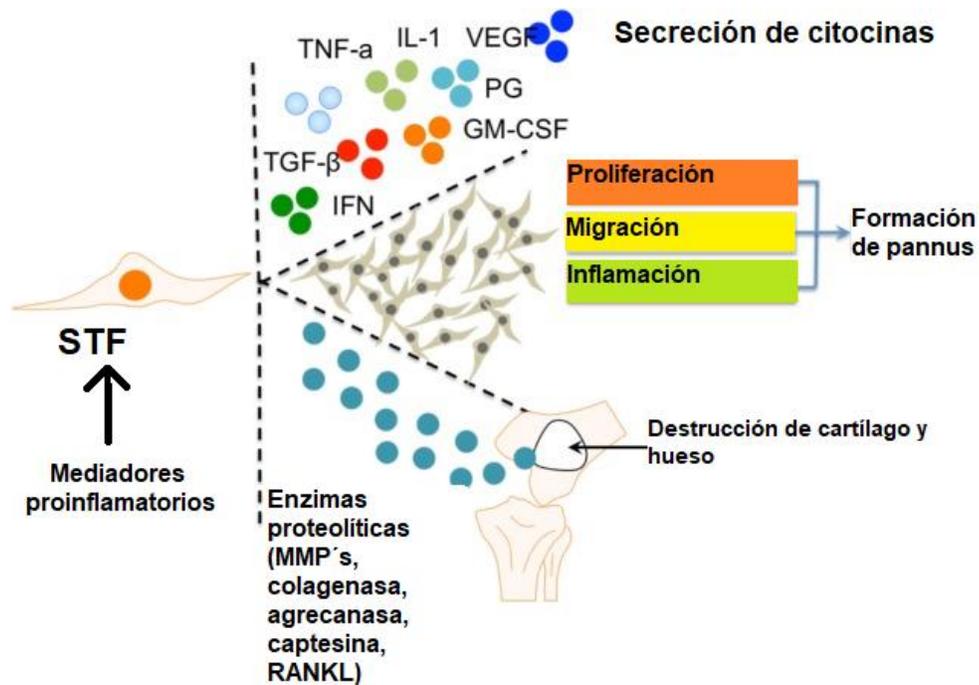


Figura 2. Representación gráfica de la influencia de los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) en la artritis reumatoide (AR). Los STF al ser activados por mediadores proinflamatorios son protagonistas en la AR induciendo la sinovitis, crecimiento del pannus, la destrucción del cartilago y la erosión del hueso. Abreviaturas: TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; IL-1, interleucina 1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; PG, prostaglandina; IFN, interferón; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; MMP, metaloproteinasas de matriz extracelular; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B. Modificado de Tu J., *et al.*, 2018.



2.1.2. Mediadores proinflamatorios

La AR se caracteriza por presentar una amplia gama de factores proinflamatorios [14] (Tabla 2) que actúan sobre los diversos tipos celulares de la articulación como los STF, STM, condrocitos, osteoclastos, células endoteliales, entre otros, para promover la hiperplasia del tejido sinovial [14] y el reclutamiento articular de células inmunes [35] (sinovitis) desencadenando así una degradación paulatina de la matriz extracelular [14]. Uno de los mediadores proinflamatorios más importantes es el óxido nítrico (NO), el cual se encuentra elevado en el líquido sinovial de las articulaciones artríticas [43, 44] relacionado directamente con la severidad de la AR [8, 45] determinante de daños tisulares sobre el cartílago y hueso [46-49].

Clasificación	Proteína
Mediadores inducibles	COX-2, NO
Moléculas de adhesión celular	ICAM-1, VCAM-1, E-selectina
Citocinas	IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN γ , TNF α
Quimiocinas	IL-8, CCL3, MCP-1
Factores de crecimiento	G-CSF, M-CSF, GM-CSF
Moléculas inmunorreguladoras	Cadena ligera de Ig κ , MHC clase I y II, receptor de células T α y β
Proteínas de fase aguda	SAA, factores de complemento B, C3 y C4

Tabla 2. Mediadores proinflamatorios sistémicos y locales en la artritis reumatoide. COX-2: ciclo-oxigenasa 2; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión celular vascular; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos; SSA: amiloide sérico A. Modificado de Arend W.P., 2001 & Bingham C.O., 3ed 2002.

2.2. El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso que actúa como potente mediador químico de diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas que se incluyen en la inflamación, la neurotransmisión, la apoptosis y el tono vascular tanto sanguíneo como de las vías respiratorias [50-53]. Su biosíntesis es producto de la reducción de la L-arginina [52] por las óxido nítrico sintasas (NOS) [54, 55] que comprenden tres isoformas distintas, dos constitutivas [neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS)] y la inducible (iNOS) [56]. La expresión



de esta última es inducida transcripcionalmente en una amplia gama de células por acción de citocinas proinflamatorias, endotoxinas bacterianas, entre otros [57-59]. La iNOS genera grandes cantidades (nM) de NO [60] con acciones promotoras de la respuesta inmune [55, 61, 62], antimicrobianas [63], antivirales [64], antiparasitarios y antitumorales [65]. Sin embargo, la inducción aberrante de NO promueve la progresión de varias enfermedades debido a sus efectos citotóxicos [56, 58]. La AR es una de estas enfermedades donde la producción aberrante de NO se ha asociado con su progresión [7].

2.2.1. Implicación del óxido nítrico en la artritis reumatoide

Diversos estudios indican que en los pacientes con AR hay un aumento en la biosíntesis de NO a nivel sistémico [8, 60] y en el líquido sinovial [44] donde se ha descrito su contribución en el daño articular. Tipos celulares de la articulación como las células endoteliales de los capilares sinoviales, neutrófilos, fibroblastos, linfocitos, mastocitos y macrófagos comparten la facultad de llevar a cabo la biosíntesis de NO, no obstante, la expresión de la iNOS durante la sinovitis únicamente se ha reportado en los macrófagos, condrocitos, sinoviocitos, osteoblastos y osteoclastos [66, 67].

La presencia en la articulación artrítica de múltiples mediadores proinflamatorios [12, 68], induce un aumento en la expresión génica de la iNOS y, por ende, un aumento en los niveles intraarticulares de NO que, a través de su reacción con el superóxido (O_2^-), genera peroxinitrito (NO_3^-) responsable del daño tisular del cartílago y el hueso [46, 47]. Por ello el estudio de factores que estén involucrados en la regulación de la biosíntesis del NO a través de la iNOS es de gran interés clínico en enfermedades inflamatorias como la AR. Uno de estos factores podría ser la prolactina (PRL). En cultivos de fibroblastos de pulmón bajo un tratamiento con PRL se observó la reducción de la expresión genética de la iNOS y la biosíntesis de NO en respuesta a citocinas proinflamatorias. Sin embargo, el efecto de la PRL sobre la AR sigue siendo controversial pues hay evidencias de que, bajo condiciones de inflamación, esta hormona puede ser procesada proteolíticamente hacia un fragmento de PRL con efectos proinflamatorios [4].

2.3. La prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona proteica constituida por 199 aminoácidos conocida por su papel en la regulación de la lactancia [69]. Sin embargo, la PRL ejerce una gran diversidad de funciones fisiológicas en la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, la función cerebral, el metabolismo, la respuesta inmune y la angiogénesis [70-75].



La PRL se produce principalmente por células lactotropas de la glándula pituitaria anterior [76, 77], pero también en tejidos extrahipofisarios [78, 79] que incluyen al articular, específicamente a los STF [80], condrocitos [81], células endoteliales [82, 83] y células inmunes [73, 78-80, 84]. De hecho, se ha reportado que la PRL es un componente del líquido sinovial donde ejerce un efecto positivo en la formación y mantenimiento del cartílago a través de estimular la proliferación y diferenciación de los condrocitos [85].

Las acciones de la PRL están mediadas por su interacción con su receptor transmembranal (PRLR), para el cual se han descrito tres isoformas distintas: la corta, intermedia y larga [70], siendo esta última la responsable de la mayoría de sus acciones. La activación del PRLR señala a través de su vía canónica JAK2 (Janus Kinasa 2) y STAT (Signal Transduction Activators of Transcription), pero también mediante otras vías de señalización que incluyen la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositol 3-quinasa / Akt (PI-3K / Akt), entre otras [86].

2.3.1. La prolactina en la artritis reumatoide

La PRL se ha asociado con la patofisiología de la AR [4], si bien dicha asociación no es del todo clara. Se ha reportado que algunos pacientes con AR presentan niveles elevados de PRL [87] pero no se ha observado una correlación entre los niveles de PRL y la severidad en la AR [4]. Por otro lado, bajo condiciones de hiperprolactinemia fisiológica como lo son el embarazo y la lactancia, se presenta una remisión [87] y una exacerbación [88] de la AR, respectivamente. Asimismo, el uso de agonistas y antagonistas dopaminérgicos que reducen y elevan los niveles circulantes de PRL se han asociado con resultados controversiales sobre la progresión de la AR [4]. Esta dualidad de efectos podría asociarse a condiciones fisiopatológicas diferentes. Por ejemplo, en modelos murinos, el tratamiento prolongado con PRL aumenta la formación ósea durante el crecimiento [89] pero la disminuye en ratas lactantes o sexualmente maduras [90, 91].

Estudios recientes en modelos experimentales de AR mostraron un valor protector de la hiperprolactinemia. El tratamiento con PRL redujo la producción articular de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL6, TNF α e IFN γ), el dolor, la inflamación de la articulación y la apoptosis de los condrocitos [10], así como la generación de osteoclastos y la destrucción del hueso [11] en el modelo de artritis inducida por adyuvante en la rata. Sin embargo, la PRL también puede promover la angiogénesis a través de estimular la expresión de factores



proangiogénicos como VEGF [82, 83] y el FGF-2 [92, 93] y, por ende, la hiperplasia y la supervivencia del pannus.

Uno de los mecanismos que podría explicar los efectos controversiales de la PRL en la AR es su conversión proteolítica hacia la vasoinhibina, un fragmento de la PRL con efectos opuestos sobre los vasos sanguíneos y las reacciones inflamatorias [4, 12, 72].

2.4. La vasoinhibina

La vasoinhibina forma parte de una familia de péptidos, derivados por escisión proteolítica de la PRL, que inhibe la vasodilatación, la vasopermeabilidad, y la angiogénesis [94]. Esta escisión se produce por diversas proteasas cerca o dentro del asa que conecta la tercera y cuarta alfa-hélices de la PRL (Figura 3) [74]. La catepsina D (CD) [95], la proteína morfogénica ósea 1 (BMP-1) [96], y las MMPs [81], escinden a la PRL a isoformas de la vasoinhibina cuyas masas moleculares varían desde los 11 a los 18 kDa, todas ellas compartiendo la región N-terminal de la PRL [72].

Se ha reportado que los niveles de PRL [85] y MMPs [97] en el líquido sinovial de pacientes artríticos se encuentran elevados, por lo que la biosíntesis de vasoinhibina se puede llevar de manera local en los tejidos articulares como el cartílago [81], endotelio vascular [98], sinoviocitos tipo fibroblasto [12, 80] y las células inmunes [72, 73, 99, 100]. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que lisados de condrocitos articulares cortan a la PRL a vasoinhibina a través de proteasas como las MMPs y la CD. Además, se evidenció que la vasoinhibina así generada es funcional dado que inhibe la proliferación de células endoteliales en cultivo [81]. Por otra parte, también se ha demostrado que la vasoinhibina puede actuar como citocina proinflamatoria [12], por lo que el estudio de sus efectos en la AR es de gran interés.

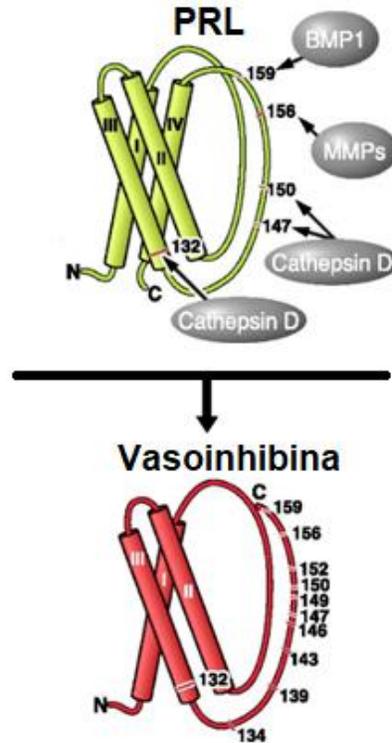


Figura 3. La formación de vasoinhibina a partir de la prolactina (PRL). Proteasas como la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (BMP1), las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) y la catepsina D escinden a la PRL en las posiciones indicadas por las flechas, generando así un fragmento NH₂ – terminal, correspondiente a vasoinhibina. Las moléculas están codificadas por colores en verde por sus propiedades angiogénicas y en rojo por sus efectos anti-angiogénicos. Modificado de Clapp C., *et al.*, 2009.

2.4.1. La vasoinhibina y la inflamación

Como hemos mencionado, los efectos vasculares son los más estudiados de la vasoinhibina e incluyen acciones directas sobre células endoteliales inhibitorias de la angiogénesis y vasopermeabilidad [94]. Sin embargo, mediante un análisis molecular de microarreglos en este tipo celular, se demostró que bajo un tratamiento con vasoinhibina también se induce la expresión de genes involucrados en la inflamación como citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL8, TNF α), quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL8, CCL2, CCL5, CCL8, CCL20, CCL26) y moléculas de adhesión celular (ICAM1, VCAM1, E-selectina) entre otros. Aunado a esto, la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión inducida por la vasoinhibina en el endotelio vascular fue capaz de inducir la infiltración de células inmunes en tumores de melanoma a través de la activación del factor NF κ B [101].



De hecho, el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina ya se había demostrado en fibroblastos de pulmón que son células protagónicas de las reacciones inflamatorias de las vías respiratorias [12]. Se encontró que la vasoinhibina induce de manera dosis dependiente la expresión de la iNOS y la producción de NO con una potencia similar al de un tratamiento con una combinación de tres citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IFN γ) y que estas acciones son mediadas a través de la translocación nuclear de la subunidad p65 del NF κ B a través de la fosforilación de I κ B- β [12, 13, 101]. Es importante destacar, que el NF κ B orquesta la expresión de genes que codifican una diversidad de mediadores proinflamatorios [102, 103] que conllevan a un incremento en la infiltración de leucocitos en la articulación artrítica y sostienen la respuesta inflamatoria en la AR [12, 101, 104] y donde uno de estos mediadores proinflamatorios es el NO [13, 105].

Dados estos antecedentes, es posible que la vasoinhibina también promueva el proceso inflamatorio de la articulación. Por lo que, dada la importancia de los STF en la respuesta inflamatoria articular y la similitud de los STF con los fibroblastos de pulmón [36], en este trabajo investigamos el posible efecto inflamatorio articular de la vasoinhibina a través de evaluar su acción sobre la producción de NO vía la activación de la iNOS en cultivos primarios de STF.



III. Justificación

La AR es una enfermedad inflamatoria autoinmune que afecta principalmente las articulaciones y que, dada su prevalencia en la población, representa una de las principales causas de discapacidad mundial. Los mediadores inflamatorios que influyen en el desarrollo de la patología son diversos, pero entre ellos destaca el óxido nítrico, cuyos niveles se han relacionado directamente con la actividad de la enfermedad. En el presente proyecto, se pretende estudiar si la vasoinhibina puede tener acciones pro-inflamatorias en la articulación a través de evaluar su efecto sobre la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible y la producción de óxido nítrico en cultivos de STF. Esta información permitirá comprender mejor la influencia controversial de la PRL en la patofisiología de la AR.



IV. Hipótesis

La vasoinhibina actúa como citocina proinflamatoria en los STF al inducir la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y la producción de óxido nítrico.

V. Objetivos

5.1. Objetivo General:

Evaluar el efecto de la vasoinhibina sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y la producción de óxido nítrico en cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblasto utilizando diversas técnicas experimentales (inmunocitoquímica, qRT-PCR, Western blot y evaluación bioquímica de nitritos y nitratos) para determinar su acción proinflamatoria sobre la articulación.

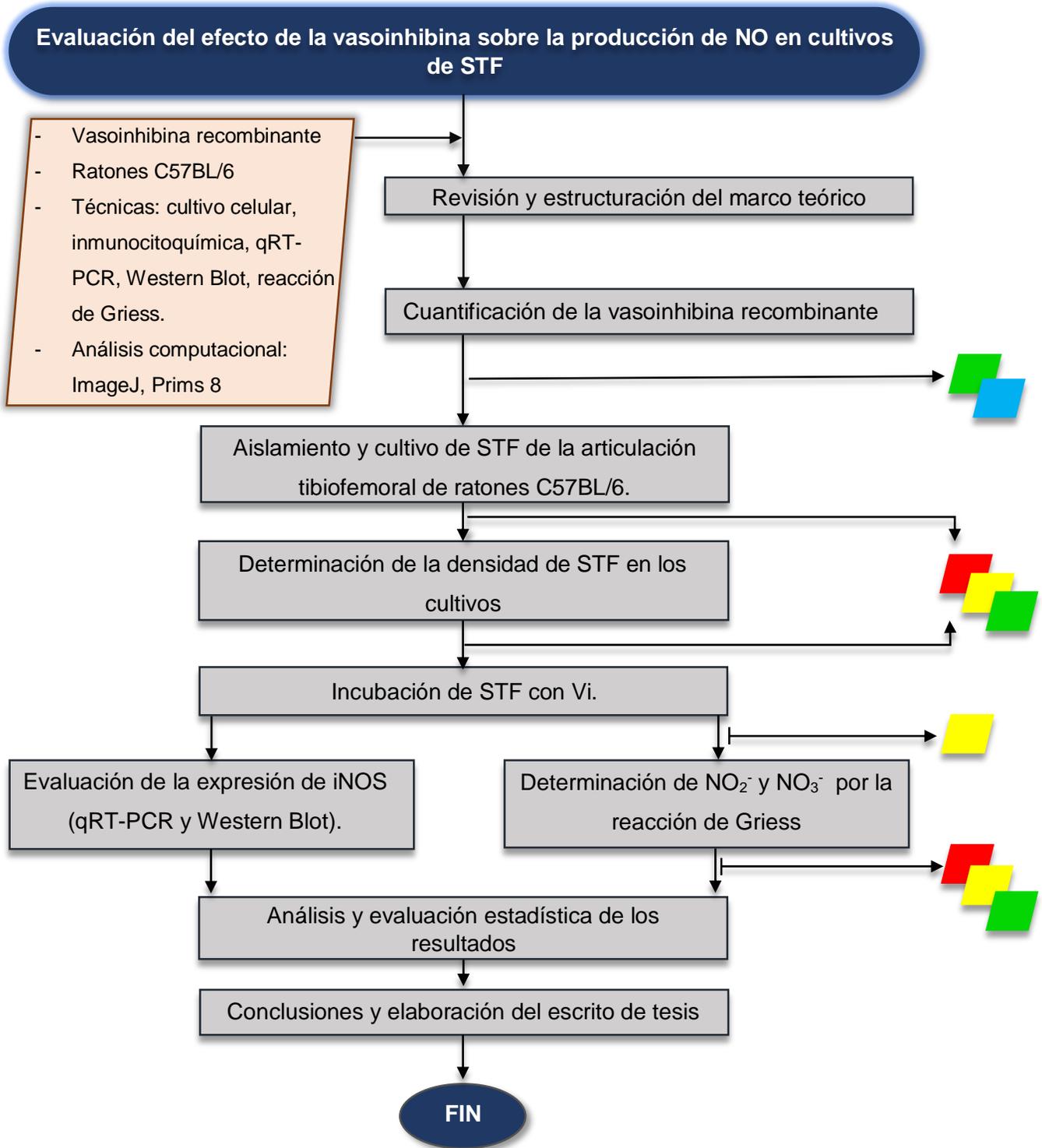
5.2. Objetivos Específicos:

- ❖ Analizar la muestra de vasoinhibina recombinante asignada para el desarrollo experimental a través de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y revelado con azul de Coomassie para confirmar su peso molecular y concentración.
- ❖ Determinar la pureza de los cultivos primarios en sinoviocitos tipo fibroblasto aislados a partir de la articulación tibiofemoral de ratones C57BL/6 mediante inmunocitoquímica para validar el efecto de la vasoinhibina sobre este tipo celular.
- ❖ Analizar el efecto de la vasoinhibina sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (ARNm y proteína) en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto a través de qRT-PCR y Western blot para determinar su acción proinflamatoria.
- ❖ Evaluar el efecto de la vasoinhibina sobre la producción de óxido nítrico en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto a través de la determinación bioquímica de los metabolitos estables del NO, nitritos y nitratos (reacción de Griess) para corroborar su acción sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible.



VI. Metodología

6.1. Diagrama organizacional





Simbología	Tipo de residuo	Tratamiento
R1	Biológico	Cadáveres: depositar en reservorio y mantener en congelación para su posterior incineración. Células: Desactivar en disolución diluida de hipoclorito de sodio. Medio de cultivo (pases): Desactivar en alcohol desnaturalizado (70%) y desechar al drenaje.
R2	Plásticos, metal y vidrio.	Todo aquello en contacto con células: desactivar en disolución de hipoclorito de sodio. Lavar con jabón y enjuagar con abundante agua. Esterilizar según convenga.
R3	Sólidos y semisólidos	Residuos de acrilamida gelificado: desechar al reservorio correspondiente.
R4	Líquidos	Buffer: desechar al drenaje. Paraformaldehído: Depositar en reservorio destinado para su colecta por la autoridad responsable de su manejo.

Tabla 3. Simbología de la clasificación de residuos y su respectivo desecho en la conducción de la tesis.



6.2. Electroforesis y azul de Coomassie

La vasoinhibina recombinante (Lote: 200818 generada mediante ADN recombinante en células de insecto de acuerdo al método publicado por Galfine M., *et al.*, 2003 [106]) se procesó mediante electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para corroborar su concentración. Cantidades crecientes de la vasoinhibina (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μg) y de albúmina sérica bovina (0.1, 0.2, 1.0, 2.5, 5.0 μg) se procesaron en el mismo gel (120 V durante 3 h) y se tiñó durante la noche con azul de Coomassie (0.25 % azul de Coomassie [Bio-Rad, California, USA] en 1:45:45 ácido acético: metanol: agua). El colorante se eliminó (15:20:65 ácido acético: metanol: agua) a través de varios cambios a lo largo de 24 h. El gel se digitalizó, se determinó la densidad de las bandas proteicas mediante el software de ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) y los valores correspondientes a vasoinhibina se interpolaron en una curva estándar elaborada con las diferentes concentraciones de la albúmina.

6.3. Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 4 a 6 semanas de edad, mantenidos en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro. Los ratones se mantuvieron de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [107] y todos los experimentos se aprobaron por el Comité de Bioética del INB. Los animales fueron alojados en condiciones controladas de luz (ciclos de luz y oscuridad de 12 h cada uno), temperatura (22 °C), ventilación (12-15 cambios por hora), humedad (45-60 %) y alimento (*ad libitum*). Se practicó la eutanasia de los animales vía exposición a una atmósfera saturada de CO_2 y decapitación.

6.4. Extracción de sinoviocitos tipo fibroblasto (STF)

La extracción de STF se procedió según el protocolo establecido por Zhao, J., *et al.* [108]. Se realizó la extracción de la articulación fémur / fibula / tibia de las extremidades posteriores y se le lavó en solución salina balanceada de Hank con antibióticos (250 μL de gentamicina [10 mg/mL; Gibco by life technologies, Grand Island, NY]) y antifúngica (50 μL de anfotericina B [250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gibco by life technologies, Grand Island, NY]). La piel, músculos y tendones adheridos fueron removidos por microdissección, teniendo cuidado de no dañar los huesos. Cualquier articulación con hueso dañado fue inmediatamente



eliminada del proceso de aislamiento para prevenir la contaminación del cultivo de STF con células de la médula ósea. Se expuso la membrana sinovial a través de retirar la rótula y la articulación se incubó en medio enriquecido DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alto en glucosa suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY, USA) inactivado por calor conteniendo 1% de penicilina / estreptomicina (Invitrogen), 2 mg/mL de colagenasa tipo IV (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) y 0.2 mg de desoxirribonucleasa 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37 °C por 3 h bajo agitación (300 rpm). El extracto se filtró con un poro de 100 mc y a partir del cual se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación (1200 rpm/ 37 °C) que se resuspendió en DMEM 20 % de SFB y cultivó en placas de 6 pozos bajo una atmosfera de 5% dióxido de carbono (CO₂) a 37 °C hasta que se logró una confluencia celular del 80 al 90%. Alcanzada la confluencia se realizó el primer pase (P1), para lo cual se retiró el medio DMEM y se añadió tripsina (Gibco by life technologies, Grand Island, NY) para obtener el paquete celular el cual se resuspendió en DMEM 20%. Este proceso se repitió dos veces más y los cultivos resultantes (P3), enriquecidos en STF, se utilizaron para los distintos experimentos.

6.5. Conteo celular con la cámara de Neubauer y estacionamiento de las células

Se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer de suspensiones del P3 de STF (10 µL de la suspensión celular adicionada con 10 µL de azul de tripano), el cual se agregó a la cámara de Neubauer, se observó en el microscopio, y se determinó el número total de células no teñidas por el colorante mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Total células contadas}}{\text{Número de cuadros}} (2) (10,000)$$

Donde:

Concentración celular = Número de células por mililitro

Número de cuadros = 4

El valor de 2 es el factor de dilución células: azul de tripano.

El valor de 10,000 se obtiene de:

a) Cálculo del área del primer cuadrante

$$\text{Área} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$



- b) Cálculo del volumen del primer cuadrante

$$\text{Volumen} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1\text{mm}^3$$

Equivalente a $1 \times 10^{-4} \text{mL}$

- c) Por lo tanto, para un mililitro:

$$\frac{1\text{mL}}{1 \times 10^{-4}\text{mL}} = 10,000$$

6.6. Caracterización de los cultivos de STF

La evaluación del grado de pureza de los cultivos de STF se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra el marcador de fibroblastos CD-90.2 de acuerdo al protocolo reportado por Hardy, R. S., *et al* [109]. Brevemente, se sembraron 50,000 células en cubreobjetos redondos de 18 mm contenidos en placas de 12 pozos cubiertos con 300 μL de DMEM 20 % SFB por 12 h. Se retiró el medio y se realizó un lavado con 400 μL de PBS. Posteriormente, se fijaron las células con paraformaldehído 4 % (a temperatura ambiente [°TA] por 1 h), se lavaron inmediatamente con PBS y se les bloqueó con PBS + 0.05% Tritón X-100 + 1% BSA +5 % NGS (°TA por 1 h). Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a incubar a las células con el anticuerpo primario anti CD-90.2 (1:250, 4 °C por la noche; 550543, BD Bioscience). Después de la incubación, las células se lavaron con PBS (3 min con agitación muy baja) y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500, °TA por 2 h; A21208, invitrogen). Por último, los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con vectashield + DAPI (Vectashield®, CA, USA) para su visualización en un microscopio invertido de fluorescencia. Las imágenes se digitalizaron y analizaron utilizando el programa ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) [110].

6.7. Expresión de la iNOS

6.7.1. Extracción de ARN

Para determinar la expresión de la iNOS en los cultivos de STF tratados con vaso-inhibina recombinante (Lote: 200818), se extrajo el ARN adicionando 500 μL de TRIzol (Invitrogen, Gran Island, NY) para recuperar el contenido celular y disociar los complejos nucleoprotéicos. Se agregaron 100 μL de cloroformo, y el extracto se agitó e incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó (13,000 rpm por 25 min a 4 °C). Se recuperó



la fase acuosa e inmediatamente se adicionaron 250 μ L de alcohol isopropílico seguido de una agitación vigorosa y una incubación por 24 h a -20 °C. Posteriormente la muestra se centrifugó (12000 rpm/20 min) y el pellet obtenido se lavó con etanol (70 %, 0.5 mL), se centrifugó y decanto teniendo cuidado de preservar el precipitado, el cual se dejó secar, y se diluyó con 18 μ L de agua libre de nucleasas. El ARN se almacenó a -70 °C hasta su uso.

6.7.2. Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó a partir del ARN extraído, haciendo uso de la enzima transcriptasa reversa, deoxinucleótidos, oligonucleótidos y agua libre de nucleasas. Se incubaron las muestras por dos horas a 37 °C, según especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). El ADNc se diluyó con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 10 ng/ μ L, y se almacenó a 4 °C.

6.7.3. qRT-PCR

La PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizó en una mezcla de reacción conteniendo Máxima ® SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Auburn, USA), los oligonucleótidos y el ADNc en un volumen final de 10 μ L. El nivel de expresión se normalizó a la expresión del gen constitutivo que codifica para la hypoxantinaganina fosforisiltransferasa (*hprt*).

Gen	Sentido	Antisentido	°T de alineación
<i>Hprt</i>	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2 °C
<i>Inos</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	60.2 °C

Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para determinar el nivel de expresión del gen de interés (*Inos*) y el gen constitutivo (*Hprt*).

6.8. Western blot

Para determinar la proteína iNOS en los cultivos de STF tratados con vaso inhibina, se realizó la extracción de proteína total a través de homogenizar las células con 100 μ L de amortiguador de lisis o RIPA (50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM cloruro de sodio, 1 % Igepal, 0.5 % Desoxicolato de sodio, 0.1 % dodecilsulfato de sodio) conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma, St. Louis, MO). Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford usando el reactivo de ensayo Bio-Ray (Bio-Ray Laboratories, Hercules, CA) y 50 μ g de proteína se evaluaron mediante electroforesis de acrilamida en condiciones



desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Western Blot. Brevemente, la separación de las proteínas se realizó por electroforesis (120 V durante 3 hrs) y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa fue durante 45 a 60 min bajo 23 a 25 V. Las membranas se bloquearon con 5 % de leche y posteriormente se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios Anti-iNOS (1:250; AB150171; EMD Millipore, Darmstadt, Germany) y anti- β -Tubulina (1:1000; AB6046; Abcam, Cambridge, MA, USA). Las membranas se lavaron con PBS/Tween-20 y la detección se realizó utilizando un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina o peroxidasa (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc). La densidad de las bandas se cuantificó mediante el software de ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

6.9. Cuantificación de óxido nítrico mediante la reacción de Griess

Para evaluar cuantitativamente el efecto de la vasoinhibina sobre la producción de NO en los cultivos de STF, se procedió según el protocolo reportado por Corbacho, A. M., *et al.* [12]. Se agregaron 100 μ L de solución 1 (2.5 mL HEPES 1 M, pH 7.5; 1.25 mL agua; 1.25 formato de amonio 2.4 M pH 7.2 y 125 μ L de la enzima nitrato reductasa de *E. coli*) por cada 100 μ L de cada dilución de la curva de nitrato de sodio y/o muestra. Se agitó vigorosamente y se incubó a 37 °C durante una hora. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 3 min y los 100 μ L de sobrenadante se transfirieron a una placa de ELISA en la cual se le añadieron 100 μ L de la solución de Griess (1 g sulfanilamida; 0.1 g Naftiletilendiamina [NEDA] y 2.9 mL ácido fosfórico concentrado en condiciones de oscuridad). Por último, se obtuvieron valores en el espectrofotómetro a 490 nm. Se calculó la concentración micromolar de nitratos y nitritos de las muestras y se normalizó con la cantidad de proteína cuantificada mediante Bradford.

6.10. Análisis estadístico

Las diferencias entre dos grupos se evaluaron mediante el análisis paramétrico T de student. Las diferencias entre tres o más grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc Tukey. Las diferencias se consideran significativas para $p < 0.05$.



VII. Resultados

7.1. La vasoinhibina recombinante tiene un peso molecular aparente de 16kDa y una concentración de 153.62 ng/ μ L.

La vasoinhibina que utilizamos para analizar su efecto inflamatorio sobre los STF fue producida en células de insecto de acuerdo al método publicado [106]. Como primer paso, evaluamos su concentración mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Comparamos cuatro diluciones diferentes de la vasoinhibina con concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) procesadas en el mismo gel, que fue teñido para proteína total con el colorante azul de Coomassie (Figura 4). La BSA y vasoinhibina migraron con los pesos moleculares esperados de 66.38 kDa y 16 kDa, respectivamente. El análisis densitométrico de las bandas proteicas nos permitió graficar la curva estándar de la BSA e interpolar en ella los valores de la vasoinhibina. Este análisis arrojó una concentración de 153.62 ng/ μ L.

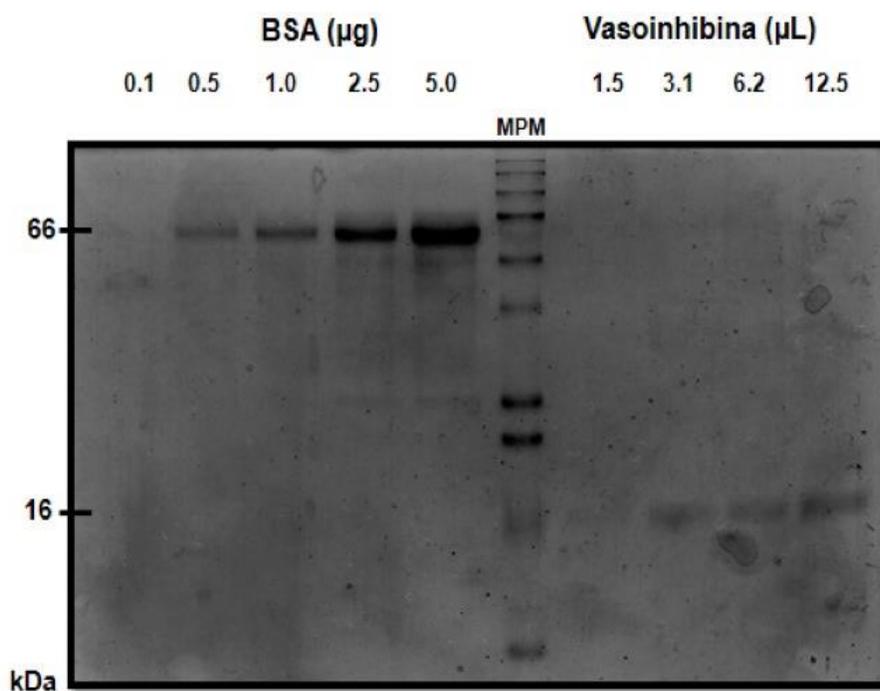


Figura 4. La vasoinhibina tiene un peso molecular aparente de 16kDa y una concentración de 153.62 ng/ μ L. Evaluación por SDS-PAGE las proteínas BSA (0.1, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 μ g) y vasoinhibina (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 μ g) reveladas con azul de Coomassie.



7.2. Los cultivos celulares están enriquecidos de sinoviocitos tipo fibroblasto.

Los STF representan la mayor proporción (80%) de los sinoviocitos en la capa íntima de la membrana sinovial [109, 111]. Utilizamos el procedimiento previamente publicado para aislar los STF de la membrana sinovial del ratón [108]. Los cultivos recién aislados se incubaron durante 7 días para aumentar la densidad celular (P0) y una vez alcanzada del 80 al 90 % de confluencia, se desprendieron las células y cultivaron consecutivamente tres veces (P3). Evaluamos la densidad de STF mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra CD90, un marcador específico de fibroblastos, sobre el total de células teñidas para ADN con DAPI [36]. Observamos que ~ 99 % de las células tenidas con DAPI colocalizaban con CD90 y, por ende, que los cultivos son altamente enriquecidos con STF (Figura 5).

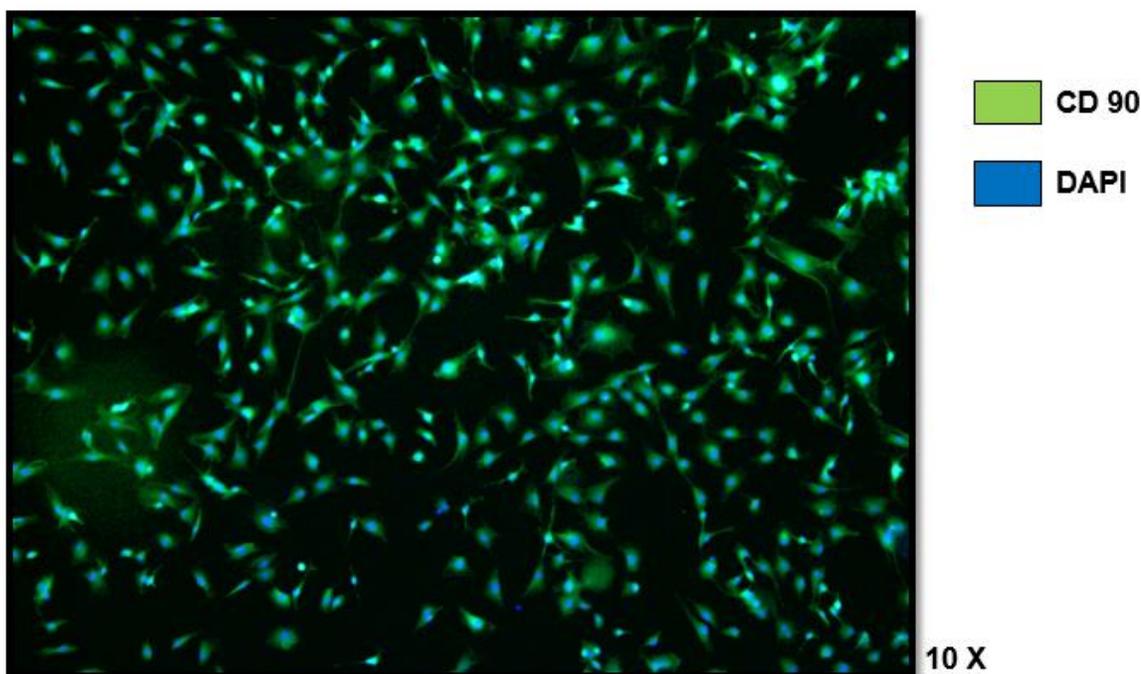


Figura 5. Los cultivos celulares están enriquecidos de sinoviocitos tipo fibroblasto. Imagen representativa de cultivos obtenidos de la membrana sinovial en su pasaje 3 (P3) sometidos a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD90 (verde) y el marcador de ADN, DAPI (azul). Magnificación 10X.



7.3. La vasoinhibina induce la expresión génica de la iNOS.

Se ha reportado que la vasoinhibina induce la expresión de mediadores proinflamatorios, específicamente de la iNOS en fibroblasto de pulmón [12], por lo que evaluamos si este efecto también se observa en los STF. Encontramos que la Vi incrementa de manera dosis dependiente los niveles del ARNm de la iNOS (Figura 6B). Para descartar un efecto debido al vehículo donde se encuentra resuspendida la vasoinhibina (HEPES 25 mM pH 7.5; glicerol 1%; Tritón X100 0.01 %), tratamos a los STF con dosis crecientes del mismo. Ninguna de las concentraciones utilizadas tuvo efecto sobre la expresión de la iNOS (Figura 6A).

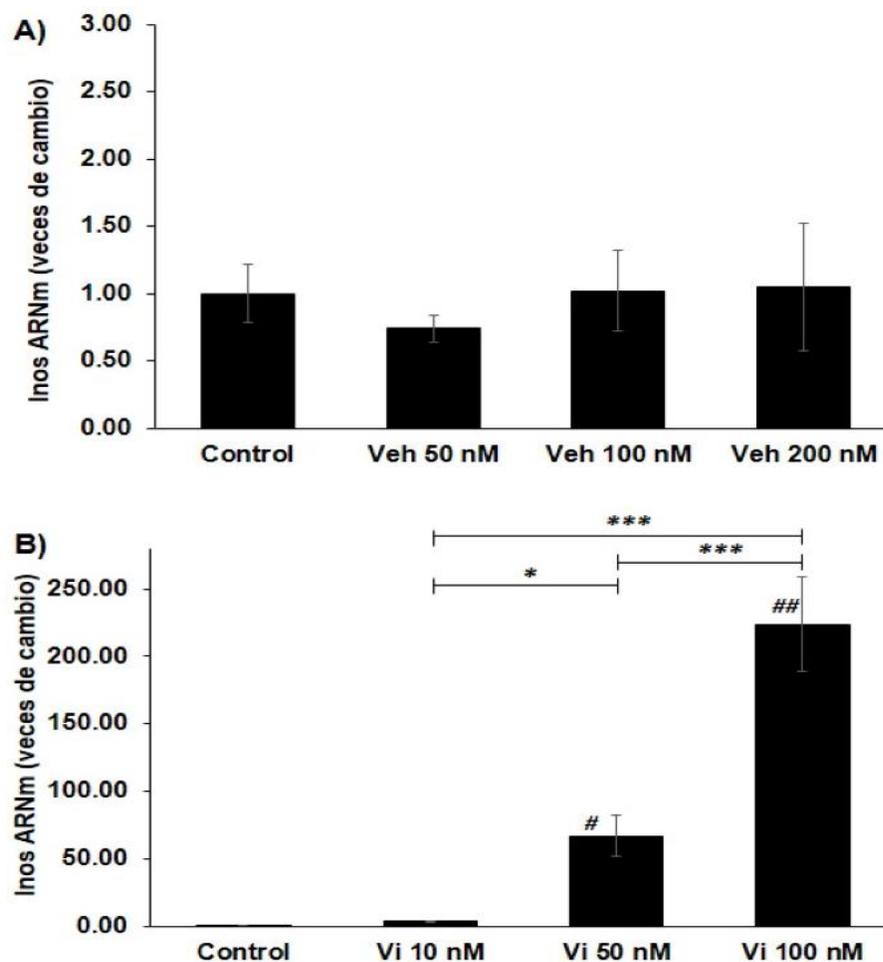


Figura 6. La vasoinhibina (Vi) induce la transcripción de la iNOS. Cuantificación por qRT-PCR de los niveles de ARNm de *Inos* en STF incubados con dosis crecientes de Vehículo (Veh) (A) o Vi (B). El nivel de expresión se normalizó con respecto al gen constitutivo (*hprt*) y se expresó con respecto al control. Los resultados corresponden a la media \pm EE de los triplicados de tres experimentos independientes. $###p < 0.001$, $#p = 0.034$ vs control; $***p < 0.001$, $*p = 0.040$.



7.4. La vasoinhibina aumenta los niveles de la proteína iNOS.

Una vez demostrado que la vasoinhibina induce la expresión del ARNm de iNOS, analizamos por Western blot si este efecto se traduce en el aumento de la proteína. Observamos que la vasoinhibina estimula la producción de la iNOS en forma dosis dependiente (Figura 7A). El análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas para la iNOS corregidas por la proteína constitutiva β -Tubulina confirmó estas diferencias (Figura 7B)

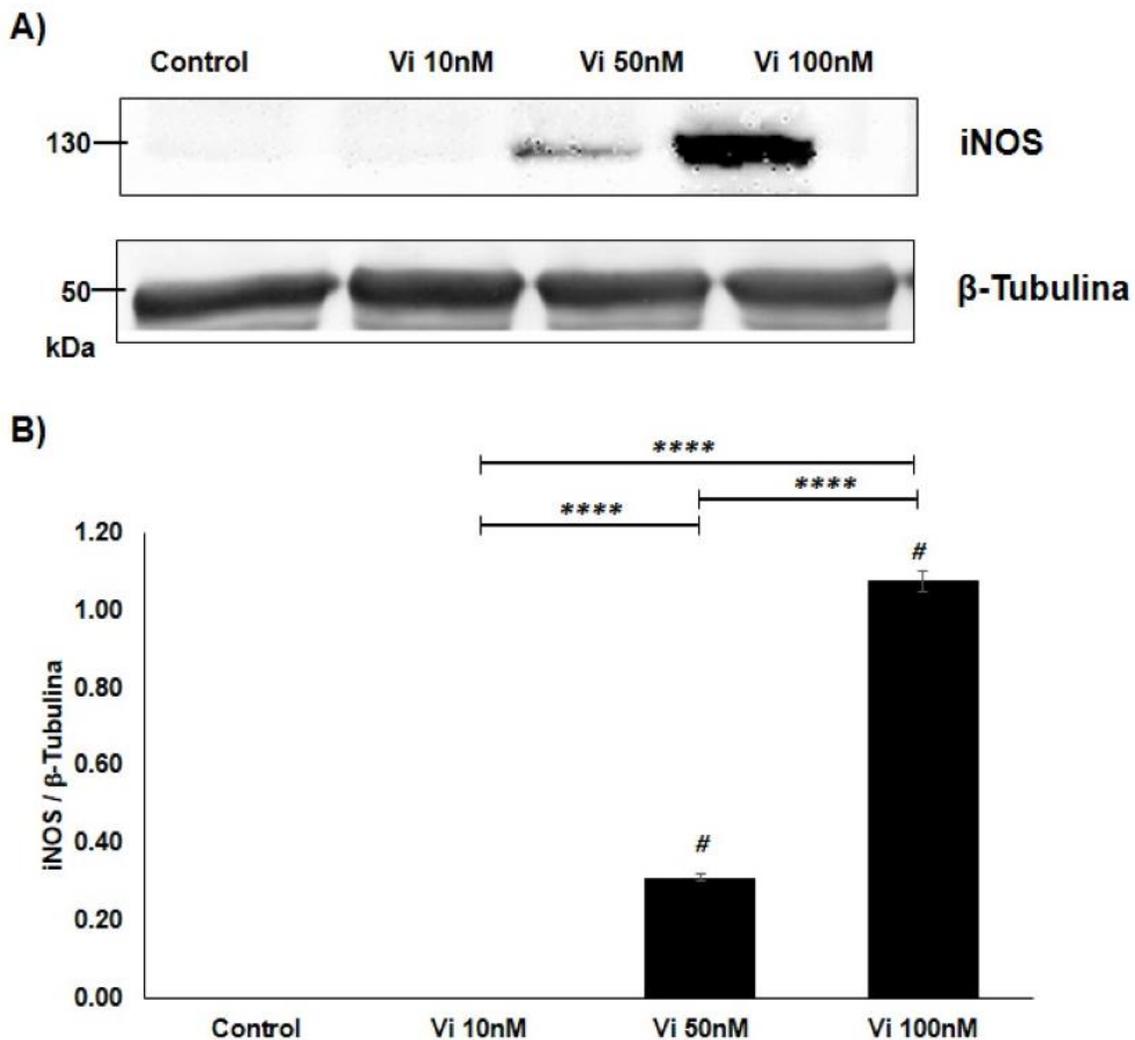


Figura 7 La vasoinhibina (Vi) aumenta la proteína iNOS en STF. A) Análisis por western blot de la proteína iNOS en STF incubados o no con dosis crecientes de Vi. B) Las barras muestran la cuantificación de iNOS/ β -Tubulina por densitometría. Los resultados corresponden a la media \pm EE de tres experimentos independientes. # $p < 0.0001$ vs control; **** $p < 0.0001$.



7.5. La vasoinhibina aumenta la concentración de óxido nítrico.

Con base a los resultados anteriores, evaluamos si el aumento tanto en la expresión (ARNm y proteína) de la iNOS inducida por vasoinhibina resulta en el aumento en la producción de óxido nítrico (NO). El NO tiene una vida media muy corta (3-6 segundos) [57] por lo que medimos su concentración indirectamente a través de cuantificar sus metabolitos estables: nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) mediante la reacción de Griess. De manera consistente encontramos que la vasoinhibina incrementa de manera dosis dependiente la producción de NO (Figura 8).

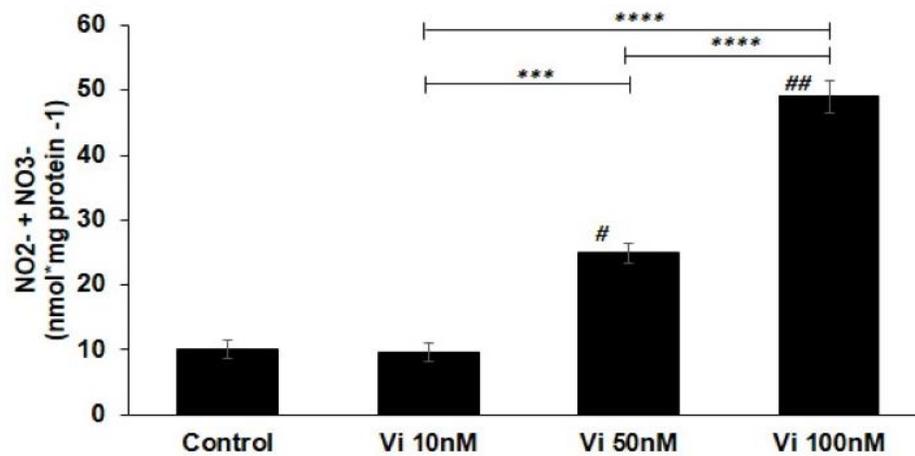


Figura 8 La vasoinhibina aumenta la producción de NO en STF. Cuantificación indirecta de NO por la reacción de Griess en STF incubados o no con dosis crecientes vasoinhibina (Vi). La concentración de los metabolitos estables del NO, nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) se normalizó con la proteína total cuantificada por Bradford. Los valores graficados representan la media \pm EE de cuatro experimentos independientes. ## $p < 0.0001$, # $p = 0.0004$ vs control; **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0003$.



VIII. Discusión

La AR es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la formación de un tejido invasivo articular denominado “pannus” [4], el cual resulta de la hiperplasia de la membrana sinovial [39, 112] y destruye el cartílago [10] y el hueso [11, 39]. El entorno proinflamatorio característico de la AR induce la activación de los STF [35] que conlleva la producción local de diversos mediadores proinflamatorios [11, 14, 36, 40] como el NO [67, 113] que contribuyen a la formación del “pannus.”

Se ha reportado que la producción del NO en la articulación artrítica es llevada a cabo por la iNOS [114]. Este mediador proinflamatorio está relacionado con la severidad de la AR [8, 44, 45, 60] al propiciar indirectamente el daño articular a través de sus acciones oxidantes sobre el cartílago [115] y el hueso [46, 47, 116]. Por ello el estudio de factores que estén involucrados en la regulación de la producción del NO a través de la iNOS en enfermedades inflamatorias como la AR, es de interés clínico.

La PRL se ha asociado con la AR en virtud de que esta enfermedad presenta un dimorfismo sexual al ser más frecuente en la mujer [4] y a que la PRL puede estimular la respuesta inmune bajo diferentes condiciones [73, 117]. De hecho, se conoce que diferentes células del sistema inmune (linfocitos T y B, macrófagos, “natural killer”) expresan el RPRL como a la propia PRL [118-120]. Sin embargo, el efecto de la PRL sobre la progresión de la AR no es claro. Se ha observado que algunos pacientes con AR presentan niveles elevados de PRL en sangre [87] pero que dichos niveles no se correlacionan con la severidad de la enfermedad. La reducción o aumento de los niveles circulantes de la PRL mediante el uso de agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos tipo D2, respectivamente, pueden tanto agravar como reducir la intensidad de la AR [4]. Más aún, condiciones de hiperprolactinemia fisiológica como el embarazo y la lactancia, ocasionan una remisión [87] y una exacerbación de la AR [88], respectivamente. Un mecanismo por el cual la PRL podría estar ejerciendo efectos opuestos sobre la inflamación articular, es a través de su conversión proteolítica hacia vaso inhibina [4], un fragmento de PRL que inhibe la vascularización del pannus [72, 100] pero que también puede promover las reacciones inflamatorias [12].

Se conoce que los tejidos de la articulación producen MMPs que cortan a la PRL a vaso inhibina [81] y que la producción de MMPs aumenta en la artritis [97]. En un estudio reciente, se observó que la terapia génica con vectores recombinantes derivados de virus



adenoasociados que transducen a la vasoinhibina reducen la inflamación articular a través de inhibir la vascularización y la vasopermeabilidad del “pannus” en el modelo de artritis inducida por una dosis alta antígeno (albúmina de suero bovina metilada) en el ratón [100]. Sin embargo, cuando se utilizó una dosis baja de dicho antígeno y, consecuentemente, se produjo una inflamación leve, la terapia génica con vasoinhibina tuvo un efecto articular inflamatorio (resultados no publicados). Estos hallazgos sugirieron que la vasoinhibina puede actuar tanto inhibiendo como promoviendo la inflamación articular en la artritis. El efecto inhibitorio es indirecto sobre el endotelio vascular [72], pero el blanco celular del efecto proinflamatorio no se conoce.

En el presente trabajo se demostró que la vasoinhibina ejerce efectos proinflamatorios sobre los STF y, por ende, que dichas células pueden ser blanco de las acciones de la vasoinhibina en la artritis. La vasoinhibina indujo la expresión tanto del ARN mensajero como de la proteína de iNOS, así como la consecuente producción de NO, en forma similar al efecto previamente observado para la vasoinhibina en fibroblastos de pulmón [12], que son células que median reacciones inflamatorias de las vías respiratorias [36].

El efecto sobre los STF se validó al demostrar que los cultivos primarios obtenidos estaban altamente enriquecidos (~ 99%) con este tipo celular. Si bien se partió de preparaciones aisladas de la articulación tibiofemoral de ratón que contienen diferentes proporciones de STF, sinoviocitos tipo macrófago (STM), adipocitos y células endoteliales vasculares [14, 109], las tripsinizaciones seriadas fueron efectivas para eliminar células contaminantes como los STM o las células endoteliales que tienen una baja tasa proliferativa, una alta adhesión, además necesitan de la suplementación de factores exógenos adicionales para su crecimiento y supervivencia en cultivo [121-124]. La pureza de los cultivos en el pasaje 3, se determinó mediante inmunocitoquímica contra CD90, una glicoproteína de superficie celular y marcador específico para fibroblastos [123] (Figura 5), resultado que coincide con lo reportado previamente en la literatura [109].

Las isoformas de vasoinhibina pueden presentar masas moleculares de 11 a 18kDa [4]. Macotela y colaboradores (2006) demostraron en condrocitos articulares que bajo un tratamiento con PRL a pH neutro, las MMPs inducen su escisión proteolítica a una vasoinhibina de 16kDa. En el presente trabajo, se comprobó mediante electroforesis y revelado con azul de Coomassie el peso molecular de 16kDa de la vasoinhibina que se utilizó en los experimentos de este trabajo (Figura 4). La vasoinhibina de esta masa



molecular es una de las más ampliamente estudiadas en modelos biológicos donde se estudian sus efectos tanto sobre los vasos sanguíneos [72] como en la inflamación [101].

La vasoinhibina estimuló la generación de iNOS y la producción de NO en los STF (Figura 6-8) y se ha reportado que el NO que resulta de la activación de la iNOS incrementa la severidad de la AR [125, 126] al promover la muerte por apoptosis de los condrocitos [66, 116, 127]. El efecto de la vasoinhibina fue dosis dependiente (Figura 6A, 7A y 7B) y descartamos que este efecto se debiera a un posible efecto tóxico del Tritón-X100 contenido en el vehículo [128] (Figura 6B).

Es posible que el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina pueda ocurrir bajo las condiciones artríticas. La PRL producida por la hipófisis anterior está siempre presente en la circulación pero además esta hormona se produce en células articulares que incluyen a los condrocitos y a las células inmunes [73, 78, 80, 81, 85] y está presente en el líquido sinovial donde además se concentran las MMPs [85, 97, 116] que se conoce convierten a la PRL a vasoinhibina [81]. Se ha demostrado que iNOS se sobreexpresa en la membrana sinovial de pacientes con AR lo que apoyaría la relación funcional entre la inflamación, el NO, la PRL y la vasoinhibina [14, 125, 129].

Diversos tipos celulares de la articulación, incluidos los STF, producen NO bajo condiciones de inflamación [66, 67]. De manera que otros tipos celulares podrían también ser blanco de las acciones proinflamatorias de la vasoinhibina. Hasta el día de hoy no es claro el mecanismo(s) por el cual el NO media sus efectos proinflamatorios [9, 67, 130, 131] en la AR dado que, aun cuando hay un aumento de este mediador en la cavidad articular, por sí solo, no es citotóxico. Se ha propuesto que sus efectos proinflamatorios derivan al reaccionar con las especies reactivas de oxígeno (ROS) para producir especies reactivas de nitrógeno (RNS) las cuales, a su vez, tienen efectos adversos en la arquitectura articular [46, 47, 66, 115, 116]. Por otro lado, también se conoce que el NO promueve la producción de MMP por diversos componentes articulares. Ambos mecanismo explican porque la degradación del cartílago y el hueso se ha asociado con niveles incrementados de NO [66, 132].

Una de las vías de señalización por las cuales la Vi podría inducir la expresión génica de iNOS en los STF, es mediante la translocación nuclear de NF κ B, un factor de transcripción asociado con la expresión de mediadores de inflamación. Se ha observado que la vasoinhibina induce la translocación nuclear de este factor en células endoteliales [133] y



fibroblastos de pulmón [13]. Además, se ha observado que la vasoinhibina promueve la activación de NF κ B a través de unirse al inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)- activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)- y el receptor de uPA (uPAR), complejo por el cual se sabe que media sus efectos sobre los vasos sanguíneos [134].

Dado que en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón la PRL inhibe la expresión de iNOS y la producción de NO [135] la conversión de esta hormona a vasoinhibina representa un mecanismo eficiente para el ajuste fino de sus acciones sobre el proceso inflamatorio. La alteración de dicha regulación fina puede ocurrir bajo condiciones patológicas y contribuir a explicar los efectos controversiales de la PRL sobre la AR. Así, resultados reportados en estudios clínicos tanto con pacientes artríticos tratados con antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol [136-140], que incrementan los niveles circulantes de la PRL, o con agonistas como la bromocriptina y cabergolina [141-145], que producen hipoprolactinemia, han reportado efectos proinflamatorios [146]. Es posible que la hiperprolactinemia y las condiciones de inflamación propicien el procesamiento proteolítico de la PRL a la vasoinhibina proinflamatoria; por otra parte, la hipoprolactinemia reduciría la influencia anti-inflamatoria de la PRL íntegra. La administración concomitante de agonistas dopaminérgicos y de inhibidores de la expresión o actividad de las MMP como el batimastat y marimastat [147-151] podría representar una nueva terapia efectiva para contrarrestar los efectos inflamatorios y destructivos de la vasoinhibina durante la AR.

El modelo *in-vitro* utilizado en el presente estudio posibilita el control de las condiciones experimentales y, permite evidenciar de manera puntual el efecto de la vasoinhibina sobre la expresión de la iNOS y la producción de NO. Sin embargo, la principal desventaja de este tipo de estudios es que imposibilita evaluar las interacciones funcionales de este tipo celular con otros componentes de la articulación e influencias sistémicas. Cabe no olvidar, que la vasoinhibina tiene efectos anti-inflamatorios sobre la artritis via sus acciones vasculares inhibitorias de la vascularización y vasopermeabilidad del pannus [100].

En resumen, el presente estudio evidencía a la vasoinhibina como un mediador proinflamatorio capaz de actuar sobre los STF. Este estudio pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos que median las acciones del sistema PRL/vasoinhibina en la artritis inflamatoria [4].



IX. Conclusión

1. La muestra de vasoinhibina recombinante (Lote: 200818) asignada para el desarrollo experimental del presente trabajo, tiene un peso molecular de 16KDa y una concentración de 153.62 ng/ μ L.
2. Los cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblasto se encuentran altamente enriquecidos (~ 99 %).
3. Los sinoviocitos tipo fibroblasto son blanco de efectos proinflamatorios de la vasoinhibina via la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y la subsecuente producción de óxido nítrico.



X. Referencias

1. Scott, I.C., J.B. Galloway, and D.L. Scott, *An Overview of Inflammatory Arthritis*, in *Inflammatory Arthritis in Clinical Practice*. 2015, Springer. p. 1-11.
2. Gabriel, S.E. and K. Michaud, *Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases*. *Arthritis research & therapy*, 2009. **11**(3): p. 229.
3. Mendoza-Vázquez, G., et al., *Artritis reumatoide y dislipidemias*. *El residente*, 2013. **8**(1): p. 12-22.
4. Clapp, C., et al., *The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016. **73**(15): p. 2929-2948.
5. George, G., G. Shyni, and K. Raghu, *Current and novel therapeutic targets in the treatment of rheumatoid arthritis*. *Inflammopharmacology*, 2020: p. 1-20.
6. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nature Reviews Immunology*, 2007. **7**(6): p. 429-442.
7. McCartney-Francis, N., et al., *Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase*. *The Journal of experimental medicine*, 1993. **178**(2): p. 749-754.
8. Ali, A.M., et al., *Níveis de óxido nítrico mais elevados estão associados à atividade da doença em pacientes egípcios com artrite reumatoide*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2014. **54**(6): p. 446-451.
9. Stefanovic-Racic, M., et al., *N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats*. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 1994. **37**(7): p. 1062-1069.



10. Adán, N., et al., *Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(9): p. 3902-3913.
11. Ledesma-Colunga, M.G., et al., *Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis*. Arthritis research & therapy, 2017. **19**(1): p. 1-16.
12. Corbacho, A.M., et al., *Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(18): p. 13183-13186.
13. Macotela, Y., et al., *RAPID COMMUNICATION: 16K Prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts*. Journal of endocrinology, 2002. **175**(3): p. R13-R18.
14. Bartok, B. and G.S. Firestein, *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunological reviews, 2010. **233**(1): p. 233-255.
15. Kahlenberg, J.M. and D.A. Fox, *Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis*. Hand clinics, 2011. **27**(1): p. 11-20.
16. Adán, N., et al., *Arthritis and prolactin: a phylogenetic viewpoint*. General and comparative endocrinology, 2014. **203**: p. 132-136.
17. Murphy, G. and H. Nagase, *Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?* Nature clinical practice Rheumatology, 2008. **4**(3): p. 128-135.
18. Kyung Chang, S., Z. Gu, and M.B. Brenner, *Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11*. Immunological reviews, 2010. **233**(1): p. 256-266.
19. Jiang, X., et al., *Comprehensive TCR repertoire analysis of CD4+ T-cell subsets in rheumatoid arthritis*. Journal of Autoimmunity, 2020: p. 102432.



20. Boissier, M.-C., et al., *Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction*. Journal of autoimmunity, 2012. **39**(3): p. 222-228.
21. Silman, A.J., J. Newman, and A.J. Macgregor, *Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a nationwide study of disease-discordant twins*. Arthritis & Rheumatism, 1996. **39**(5): p. 732-735.
22. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis*. Arthritis research & therapy, 2009. **11**(5): p. 1-14.
23. van der Woude, D., et al., *Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(5): p. 1236-45.
24. Rogers, M.P., et al., *Exacerbation of collagen arthritis by noise stress*. J Rheumatol, 1983. **10**(4): p. 651-4.
25. Jurcovicova, J., et al., *Stress of chronic food restriction attenuates the development of adjuvant arthritis in male Long Evans rats*. Clinical and experimental rheumatology, 2001. **19**(4): p. 371-376.
26. Chover-Gonzalez, A., et al., *Onset and severity of inflammation in rats exposed to the learned helplessness paradigm*. Rheumatology, 2000. **39**(7): p. 764-771.
27. Brennan, P. and A. Silman, *Why the gender difference in susceptibility to rheumatoid arthritis?* Annals of the rheumatic diseases, 1995. **54**(9): p. 694.
28. Giannini, D., et al., *One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2020. **38**: p. 387-97.
29. Hu, Y., et al., *Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women*. Annals of the rheumatic diseases, 2017. **76**(8): p. 1357-1364.



30. Drago, L., et al., *Oral–Gut Microbiota and Arthritis: Is There an Evidence-Based Axis?* Journal of clinical medicine, 2019. **8**(10): p. 1753.
31. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(23): p. 2205-2219.
32. Too, C.L., *Genetic predispositions to rheumatoid arthritis in Malaysian population*. Inst för medicin, Solna/Dept of Medicine, Solna, 2012.
33. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA–DR (shared epitope)–restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2006. **54**(1): p. 38-46.
34. Feldmann, M. and S.R. Maini, *Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 7-19.
35. Müller-Ladner, U., et al., *Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(6): p. 223.
36. Firestein, G.S., *Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?* Arthritis Rheum, 1996. **39**(11): p. 1781-90.
37. Lee, D.M., et al., *Cadherin-11 in Synovial Lining Formation and Pathology in Arthritis*. Science, 2007. **315**(5814): p. 1006-1010.
38. Edwards, J.C. and D.A. Willoughby, *Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers*. Ann Rheum Dis, 1982. **41**(2): p. 177-82.
39. Smith, M.D., *The normal synovium*. Open Rheumatol J, 2011. **5**: p. 100-6.
40. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. Front Biosci, 2006. **11**(1): p. 529-543.



41. Ritchlin, C., *Fibroblast biology Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2000. **2**(5): p. 1-5.
42. Tu, J., et al., *Ontology and function of fibroblast-like and macrophage-like synoviocytes: how do they talk to each other and can they be targeted for rheumatoid arthritis therapy?* Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 1467.
43. Liu, Y., et al., *Calreticulin induced endothelial ICAM-1 up-regulation associated with tristetraproline expression alteration through PI3K/Akt/eNOS/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis*. Mol Immunol, 2019. **107**: p. 10-20.
44. Farrell, A.J., et al., *Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases*. Ann Rheum Dis, 1992. **51**(11): p. 1219-22.
45. Ersoy, Y., et al., *Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2002. **61**(1): p. 76-78.
46. Del Carlo Jr, M. and R.F. Loeser, *Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species*. Arthritis & Rheumatism, 2002. **46**(2): p. 394-403.
47. Spiller, F., et al., *Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain*. Nitric Oxide, 2019. **89**: p. 32-40.
48. Arend, W.P., *Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist*. Semin Arthritis Rheum, 2001. **30**(5 Suppl 2): p. 1-6.
49. Bingham, C.O., 3rd, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation*. J Rheumatol Suppl, 2002. **65**: p. 3-9.



50. Brown, G.C., *Nitric oxide and mitochondrial respiration*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1999. **1411**(2-3): p. 351-369.
51. Beltrán, B., et al., *The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(26): p. 14602-14607.
52. Geller, D.A., et al., *A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(10): p. 4890-4898.
53. Thomas, D.D., et al., *Determinants of nitric oxide chemistry: impact of cell signaling processes, in Nitric Oxide*. Elsevier. 2010. p. 3-25.
54. Stuehr, D.J., et al., *Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(35): p. 36167-36170.
55. Green, S.J., C.A. Nacy, and M.S. Meltzer, *Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens*. Journal of Leukocyte Biology, 1991. **50**(1): p. 93-103.
56. Taylor, B.S., et al., *Multiple NF- κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene*. Journal of biological chemistry, 1998. **273**(24): p. 15148-15156.
57. Nathan, C., *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. The FASEB journal, 1992. **6**(12): p. 3051-3064.
58. Bredt, D.S., *Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology*. Free Radic Res, 1999. **31**(6): p. 577-96.
59. Janssen-Heininger, Y.M., I. Macara, and B.T. Mossman, *Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)- κ b: requirement of ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of Nf- κ B by*



- oxidants*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1999. **20**(5): p. 942-952.
60. Nagy, G., et al., *Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity*. Immunology letters, 2007. **111**(1): p. 1-5.
61. Kubes, P., M. Suzuki, and D. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(11): p. 4651-4655.
62. MacMicking, J., Q.-w. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annual review of immunology, 1997. **15**(1): p. 323-350.
63. Nussler, A.K. and T.R. Billiar, *Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase*. Journal of leukocyte biology, 1993. **54**(2): p. 171-178.
64. Xing, Z. and K.A. Schat, *Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus*. Journal of virology, 2000. **74**(8): p. 3605-3612.
65. Lechner, M., P. Lirk, and J. Rieder. *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin*. in *Seminars in cancer biology*. Elsevier. 2005.
66. Van't Hof, R.J. and S.H. Ralston, *Nitric oxide and bone*. Immunology, 2001. **103**(3): p. 255-261.
67. Stefanovic-Racic, M., et al., *Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes*. J Rheumatol, 1994. **21**(10): p. 1892-8.
68. Cheng, Q., H. Wu, and Y. Du, *The roles of small-molecule inflammatory mediators in rheumatoid arthritis*. Scandinavian Journal of Immunology, 2020: p. e12982.
69. Li, C.H., et al., *Amino-acid sequence of ovine lactogenic hormone*. Nature, 1969. **224**(5220): p. 695-696.



70. Bole-Feysot, C., et al., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. Endocrine reviews, 1998. **19**(3): p. 225-268.
71. Ben-Jonathan, N., C.R. LaPensee, and E.W. LaPensee, *What can we learn from rodents about prolactin in humans?* Endocrine reviews, 2008. **29**(1): p. 1-41.
72. Clapp, C., et al., *Regulation of blood vessels by prolactin and vaso-inhibins*. Adv Exp Med Biol, 2015. **846**: p. 83-95.
73. Costanza, M., et al., *Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology*. Autoimmunity reviews, 2015. **14**(3): p. 223-230.
74. Clapp, C., et al., *Peptide hormone regulation of angiogenesis*. Physiological reviews, 2009. **89**(4): p. 1177-1215.
75. Ben-Jonathan, N., et al., *Focus on prolactin as a metabolic hormone*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2006. **17**(3): p. 110-116.
76. Riddle, O., R.W. Bates, and S.W. Dykshorn, *The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1933. **105**(1): p. 191-216.
77. Gerlo, S., et al., *Prolactin in man: a tale of two promoters*. Bioessays, 2006. **28**(10): p. 1051-1055.
78. Marano, R.J. and N. Ben-Jonathan, *Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions*. Molecular endocrinology, 2014. **28**(5): p. 622-633.
79. Ben-Jonathan, N., et al., *Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects*. Endocrine reviews, 1996. **17**(6): p. 639-669.



80. Nagafuchi, H., et al., *Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis*. The Journal of rheumatology, 1999. **26**(9): p. 1890.
81. Macotella, Y., et al., *Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin*. Journal of cell science, 2006. **119**(9): p. 1790-1800.
82. Goldhar, A.S., et al., *Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1*. Molecular and cellular endocrinology, 2005. **232**(1-2): p. 9-19.
83. Malaguarnera, L., et al., *Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages*. Journal of cellular biochemistry, 2004. **93**(1): p. 197-206.
84. López-Rincón, G., et al., *Lipopolysaccharide induces the expression of an autocrine prolactin loop enhancing inflammatory response in monocytes*. Journal of Inflammation, 2013. **10**(1): p. 24.
85. Ogueta, S., et al., *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**(1-2): p. 51-63.
86. Bernard, V., et al., *New insights in prolactin: pathological implications*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(5): p. 265-75.
87. van de Geijn, F.E., et al., *Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study*. Arthritis research & therapy, 2009. **11**(6): p. R193.



88. Barrett, J.H., et al., *Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis*. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 2000. **43**(5): p. 1010-1015.
89. Krishnamra, N. and V. Cheeveewattana, *Studies of acute effect of prolactin on distribution of absorbed calcium and long-term effect on calcium balance in weaned, young, and sexually mature rats*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1994. **72**(12): p. 1521-1527.
90. Krishnamra, N. and J. Seemoung, *Effects of acute and long-term administration of prolactin on bone ⁴⁵Ca uptake, calcium deposit, and calcium resorption in weaned, young, and mature rats*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1996. **74**(10): p. 1157-1165.
91. Lotinun, S., L. Limlomwongse, and N. Krishnamra, *The study of a physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1998. **76**(2): p. 218-228.
92. Srivastava, R., et al., *Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line*. *Journal of molecular endocrinology*, 1998. **21**(3): p. 355-362.
93. Too, C.K., et al., *Prolactin induces expression of FGF-2 and a novel FGF-responsive NonO/p54nrb-related mRNA in rat lymphoma cells*. *Molecular and cellular endocrinology*, 1998. **137**(2): p. 187-195.
94. Clapp, C., et al., *Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2006. **17**(8): p. 301-307.
95. Baldocchi, R., et al., *Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D*. *Endocrinology*, 1993. **133**(2): p. 935-938.



96. Ge, G., et al., *Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(24): p. 10010-10015.
97. Takaishi, H., et al., *Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13*. Current pharmaceutical biotechnology, 2008. **9**(1): p. 47-54.
98. Clapp, C., et al., *Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects*. Journal of endocrinology, 1998. **158**(1): p. 137.
99. Martini, J.-F., et al., *The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation*. Molecular Endocrinology, 2000. **14**(10): p. 1536-1549.
100. Ortiz, G., et al., *Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis*. Laboratory Investigation, 2020: p. 1-12.
101. Tabruyn, S.b.P., et al., *The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor- κ B activation*. Molecular endocrinology, 2007. **21**(6): p. 1422-1429.
102. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-6866.
103. Gauthier, M. and B.M. Degnan, *The transcription factor NF- κ B in the demosponge *Amphimedon queenslandica*: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain*. Development genes and evolution, 2008. **218**(1): p. 23-32.
104. Macías, C., et al., *Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo*. Revista española de cardiología, 2003. **56**(2): p. 137-144.



105. Lyons, C.R., *The role of nitric oxide in inflammation*, in *Advances in immunology*. Elsevier, 1995. p. 323-371.
106. Galfione, M., et al., *Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells*. *Protein expression and purification*, 2003. **28**(2): p. 252-258.
107. NOM-062-ZOO-, N.O.M. and E.T.P. LA PRODUCCION, *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Diario Oficial de la Federación México, 1999.
108. Zhao, J., et al., *A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts*. *Biomedical reports*, 2016. **5**(2): p. 171-175.
109. Hardy, R.S., et al., *Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation*. *Arthritis research & therapy*, 2013. **15**(1): p. 1-15.
110. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
111. Okada, Y., I. Nakanishi, and K. Kajikawa, *Ultrastructure of the mouse synovial membrane*. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 1981. **24**(6): p. 835-843.
112. Bustamante, M.F., et al., *Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis research & therapy*, 2017. **19**(1): p. 1-12.
113. Xuan, Y.-T., et al., *An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(16): p. 9050-9055.
114. Santos, L.L., et al., *Suppression of adjuvant arthritis and synovial macrophage inducible nitric oxide by N-iminoethyl-L-ornithine, a nitric oxide synthase inhibitor*. *Inflammation*, 1997. **21**(3): p. 299-311.



115. Blanco, F.J., et al., *Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide*. The American journal of pathology, 1995. **146**(1): p. 75.
116. Van't Hof, R., et al., *Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint*. Rheumatology, 2000. **39**(9): p. 1004-1008.
117. Matera, L., et al., *Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes*. Brain, behavior, and immunity, 1992. **6**(4): p. 409-417.
118. Gerli, R., et al., *Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia*. Clinical and experimental immunology, 1986. **64**(2): p. 399.
119. Matera, L., et al., *Prolactin in autoimmunity and antitumor defence*. Journal of neuroimmunology, 2000. **109**(1): p. 47-55.
120. Drača, S., *Prolactin as an immunoreactive agent*. Immunology and Cell biology, 1995. **73**(6): p. 481-483.
121. Davies, J.Q. and S. Gordon, *Isolation and culture of murine macrophages*, in *Basic cell culture protocols*. Springer, 2005. p. 91-103.
122. Rosengren, S., D.L. Boyle, and G.S. Firestein, *Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts*, in *Arthritis Research*. Springer, 2007. p. 365-375.
123. Seidel, M.F., F.-W. Koch, and H. Vetter, *Macrophage-like synoviocytes display phenotypic polymorphisms in a serum-free tissue-culture medium*. Rheumatology international, 2006. **26**(3): p. 244-251.
124. Van Beijnum, J.R., et al., *Isolation of endothelial cells from fresh tissues*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 1085.



125. Armour, K., et al., *The effects of growth and ovariectomy on bone mineral density in inducible nitric oxide synthase deficient mice*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 2000. **15**(1): p. M274-M274.
126. Armour, K.E., et al., *Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(12): p. 2137-2142.
127. Grabowski, P., et al., *Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. British journal of rheumatology, 1997. **36**(6): p. 651-655.
128. Koley, D. and A.J. Bard, *Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(39): p. 16783-16787.
129. Kaur, H. and B. Halliwell, *Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients*. FEBS letters, 1994. **350**(1): p. 9-12.
130. Papaccio, G., et al., *Administration of a nitric oxide synthase inhibitor does not suppress low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice*. International journal of pancreatology, 1995. **17**(1): p. 63-68.
131. Ralston, S., *The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas!* British journal of rheumatology, 1997. **36**(8): p. 831-838.
132. Tamura, T., et al., *Nitric oxide mediates interleukin-1-induced matrix degradation and basic fibroblast growth factor release in cultured rabbit articular chondrocytes: a possible mechanism of pathological neovascularization in arthritis*. Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 3729-3737.



133. Tabruyn, S.b.P., et al., *The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor- κ B*. *Molecular Endocrinology*, 2003. **17**(9): p. 1815-1823.
134. Bajou, K., et al., *PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin*. *Nature medicine*, 2014. **20**(7): p. 741-747.
135. Corbacho, A.M., et al., *Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts*. *FEBS Letters*, 2003. **544**(1-3): p. 171-175.
136. Sellgren, C., et al., *The association between schizophrenia and rheumatoid arthritis: a nationwide population-based Swedish study on intraindividual and familial risks*. *Schizophr Bull*, 2014. **40**(6): p. 1552-9.
137. Miescher, P.A., Y.-P. Huang, and R.H. Zubler, *New approaches to the treatment of rheumatoid arthritis*. *Springer Seminars in Immunopathology*, 1988. **10**(2): p. 251-262.
138. Nakano, K., et al., *Dopamine induces IL-6–Dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 Naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model*. *The Journal of Immunology*, 2011. **186**(6): p. 3745-3752.
139. Nakashioya, H., et al., *Therapeutic effect of D1-like dopamine receptor antagonist on collagen-induced arthritis of mice*. *Modern Rheumatology*, 2011. **21**(3): p. 260-266.
140. Wahba, M.G.F., B.A.S. Messiha, and A.A. Abo-Saif, *Ramipril and haloperidol as promising approaches in managing rheumatoid arthritis in rats*. *European journal of pharmacology*, 2015. **765**: p. 307-315.
141. Salesi, M., et al., *The role of bromocriptine in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis*. *International journal of rheumatic diseases*, 2013. **16**(6): p. 662-666.



142. Mobini, M., et al., *The effect of cabergoline on clinical and laboratory findings in active rheumatoid arthritis*. Iran Red Crescent Med J, 2011. **13**(10): p. 749-50.
143. Erb, N., et al., *Control of unremitting rheumatoid arthritis by the prolactin antagonist cabergoline*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(2): p. 237-9.
144. McMurray, R.W. *Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases*. in *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier, 2001.
145. Figueroa, F., et al., *Bromocriptine induces immunological changes related to disease parameters in rheumatoid arthritis*. British journal of rheumatology, 1997. **36**(9): p. 1022-1023.
146. Capellino, S., *Dopaminergic agents in rheumatoid arthritis*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2019: p. 1-9.
147. Hande, K.R., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of prinomastat, a matrix metalloprotease inhibitor*. Clinical cancer research, 2004. **10**(3): p. 909-915.
148. Matter, H. and M. Schudok, *Recent advances in the design of matrix metalloprotease inhibitors*. Current opinion in drug discovery & development, 2004. **7**(4): p. 513-535.
149. Wojtowicz-Praga, S., *Clinical Potential of Matrix Metalloprotease Inhibitors*. Drugs in R & D, 1999. **1**(2): p. 117-129.
150. Kumar, G. and S. Swaminathan, *Recent developments with metalloprotease inhibitor class of drug candidates for botulinum neurotoxins*. Current topics in medicinal chemistry, 2015. **15**(7): p. 685-695.
151. Layfield, H.J., et al., *Repurposing cancer drugs batimastat and marimastat to inhibit the activity of a group I metalloprotease from the venom of the western diamondback rattlesnake, Crotalus atrox*. Toxins, 2020. **12**(5): p. 309.



XII. Índice de figuras

Figura 1. Representación gráfica de una articulación afectada por la AR.....	4
Figura 2. Representación gráfica de la influencia de los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) en la artritis reumatoide (AR).....	6
Figura 3. La formación de vasoinhibina a partir de la prolactina (PRL).	11
Figura 4. La vasoinhibina tiene un peso molecular aparente de 16kDa y una concentración de 153.62 ng/ μ L.	22
Figura 5. Los cultivos celulares están enriquecidos de sinoviocitos tipo fibroblasto.....	23
Figura 6. La vasoinhibina (Vi) induce la transcripción de la iNOS.....	24
Figura 7 La vasoinhibina (Vi) aumenta la proteína iNOS en STF.....	25
Figura 8 La vasoinhibina aumenta la producción de NO en STF.....	26

XIII. Índice de tablas

Tabla 1. Moléculas efectoras producidas por los STF.	6
Tabla 2. Mediadores proinflamatorios sistémicos y locales en la artritis reumatoide.....	7
Tabla 3. Simbología de la clasificación de residuos y su respectivo desecho en la conducción de la tesis.	16
Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para determinar el nivel de expresión del gen de interés (<i>Inos</i>) y el gen constitutivo (<i>Hprt</i>).	20



Por mi raza hablará el espíritu