



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANÁLOGOS DE LA VASOINHIBINA SOBRE
LA INFLAMACIÓN ARTICULAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

L.F. OSCAR FERNANDO MARTÍNEZ DÍAZ

TUTORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ LABORA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM.

DRA. VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA. UNAM.

JURIQUILLA. QUERÉTARO. QUERÉTARO. MÉXICO. OCTUBRE DEL 2023.



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.



JURADO DE EXAMEN

Integrantes:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora

Dr. David Arredondo Zamarripa

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Dra. Celina García Melendrez



*Para mis padres, hermanos,
todas y todos que luchan por sus proyectos.*



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 Labora, con el financiamiento de CONACYT (A-S1-9620) y DGAPA-PAPIIT UNAM (IN202321). Agradezco el apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera, la Dra. Xarubet RuízHerrera, la Dra. Ericka de los Ríos, el MVZ. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León.



AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, quiero expresar mi profundo agradecimiento por brindarme la oportunidad y el espacio para llevar a cabo este pequeño, pero significativo proyecto personal.

A mis padres y hermanos, quienes son una parte fundamental de mi vida, les agradezco de corazón por su apoyo inquebrantable antes y durante mis estudios de posgrado. Los amo y extraño.

A Juana Rey y Cristian Valdez, quiero expresar mi sincero agradecimiento que a pesar de la distancia han estado a mi lado, por escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles. Los quiero mucho.

A Ruth Corona y Susana Solís, les agradezco por su confianza, su tiempo compartido, las risas y los momentos especiales que siempre llevaré en mi memoria. Gracias por brindarme su amistad, las quiero mucho.

A mis amigos, José Luis Dena, Iván Luzardo, Ana Luisa Ocampo, Ricardo Echavarría, Oswaldo Sánchez y Andrés Vázquez, les agradezco por su apoyo incondicional, las risas compartidas y los valiosos consejos. También quiero expresar mi gratitud a la Dra. Florencia Assaneo por su escucha y consejos.

Elia Jiménez, quiero agradecerte por tu confianza, tu apoyo inestimable y nuestra amistad, que ha perdurado durante y después de tu estadía en el laboratorio. Te quiero.

Agradezco a la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora, la Dra. Georgina Ortiz y el M.C. Jose Fernando García por compartir su conocimiento y tiempo invaluable durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por su tutoría.

Quiero expresar mi reconocimiento al laboratorista Antonio y Daniel por su ayuda en mis experimentos. A la Dra. Alejandra Castilla, la Dra. Ericka de los Rios y la Dra. Xarubeth Ruiz, agradezco su apoyo constante.

A mi comité tutor, la Dra. Teresa Edith Garay, la Dra. Verónica Zaga Clavellina, y mi comité sinodal, el Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez, Dr. David Arredondo Zamarripa y la Dra. Celia García Melendrez, les agradezco sinceramente por sus valiosos comentarios sobre mi trabajo, sus recomendaciones y consejos.



ÍNDICE

1.	Resumen	1
2.	Abstract	3
3.	Introducción	4
4.	Antecedentes	6
4.1	Artritis reumatoide	6
4.2	Sinoviocitos tipo fibroblasto	8
4.4	Angiogénesis	11
4.5	Farmacología de la artritis reumatoide	11
4.6	La vasoinhibina	14
4.7	Vi45-51 y CRiVi45-51, análogos de la vasoinhibina	15
5.	Hipótesis	18
6.	Objetivos	18
6.1	General	18
6.2	Específicos	18
7.	Metodología	19
7.1	Animales	19
7.2	Cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto	19
7.3	Inducción del modelo de AIA grave y leve	20
7.5	Western blot	22
7.6	Cuantificación de óxido nítrico	22
7.7	Histología de la articulación. Cuantificación del área del pannus	23



7.8	Análisis estadístico-----	23
8.	Resultados-----	24
8.1	La expresión génica de <i>Inos</i> no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51 -----	24
8.2	La proteína iNOS no aumento por Vi45-51 o CRiVi45-51 -----	25
8.3	La biosíntesis de NO no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51-----	26
8.4	En el modelo de AIA leve CRiVi45-51 no modificó la inflamación articular -----	27
8.5	En el modelo de AIA grave CRiVi45-51 disminuyó la inflamación articular -----	29
8.6	En el modelo de AIA grave CRiVi45-51 disminuyó la expresión de genes asociados a la angiogénesis-----	31
9.	Discusión-----	32
10.	Conclusiones-----	38
11.	Referencias-----	39



1. Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por la formación de un frente inflamatorio sinovial, conocido como pannus, que daña tanto el cartílago como el hueso de las articulaciones. Los medicamentos utilizados actualmente para tratar la AR se enfocan en aliviar el dolor y reducir la inflamación. Sin embargo, estos medicamentos no son del todo efectivos por lo que la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología (EULAR) subraya la importancia de investigar nuevas moléculas con innovadores enfoques terapéuticos para el tratamiento de la AR. Dado que el desarrollo del pannus depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), se ha explorado el uso de los factores con propiedades antiangiogénicas. La vasoinhibina es un fragmento de la hormona prolactina (PRL) que inhibe la angiogénesis en el modelo de Artritis Inducida por Antígeno (AIA) grave en el ratón. Sin embargo, la vasoinhibina también puede tener efectos proinflamatorios en el modelo de AIA leve a través de su interacción con los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF). Recientemente, se describió que el dominio antiangiogénico de la vasoinhibina está conformada por una secuencia de tres aminoácidos (HGR) ubicados en las posiciones 46 a 48. Los hepatapéptidos que contienen esta secuencia (HGR) en su forma lineal (Vi45-51) y la secuencia cíclica en sentido inverso (CRiVi45-51) han demostrado ser efectivos para inhibir la angiogénesis. Sin embargo, aún no se sabe si Vi45-51 y CRiVi45-51 conservan los efectos proinflamatorios de la vasoinhibina. En este estudio, investigamos si los péptidos Vi45-51 y CRiVi45-51 modifican la biosíntesis del factor inflamatorio óxido nítrico (NO) vía la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en cultivos de STF. Como se esperaba, la vasoinhibina completa (utilizada como control positivo) estimuló la expresión del ARN mensajero y proteína de la enzima de iNOS, así como la biosíntesis de NO en los STF. Sin embargo, los péptidos Vi45-51 y CRiVi45-51 no tuvieron dicho efecto. Por último, evaluamos la acción in vivo de CRiVi45-51 en modelos de AIA leve y grave en ratones previamente inmunizados mediante la administración intraarticular de 2.5 o 20 μg del antígeno (ASBm, albúmina sérica bovina metilada), respectivamente. Encontramos que CRiVi45-51 no modificó la inflamación articular en el modelo de AIA leve y la redujo en el modelo de AIA grave junto con la expresión de mediadores proangiogénicos (*Vegf*, *Vegf-r2* y *Hif-1 α*). En conclusión, los péptidos Vi45-51 y CRiVi45-51 podrían ser moléculas con un efecto benéfico en el tratamiento de la AR, ya que conservan las propiedades antiangiogénicas beneficiosas de la vasoinhibina y carecen de sus efectos proinflamatorios. Estudios en curso están evaluando el efecto de CRiVi45-



51 sobre la densidad vascular en el modelo de AIA grave y el efecto de Vi45-51 sobre la inflamación articular bajo las mismas condiciones in vivo.



2. Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by the formation of a synovial inflammatory front, known as pannus, which damages both cartilage and bone in the joints. Medications currently used to treat RA focus on relieving pain and reducing inflammation. However, these drugs are not entirely effective, which is why the European Alliance of Rheumatology Associations (EULAR) stresses the importance of investigating new molecules with innovative therapeutic approaches for the treatment of RA. Since the development of pannus depends on the formation of new blood vessels (angiogenesis), the use of factors with anti-angiogenic properties has been explored. Vasoinhibin is a fragment of the hormone prolactin (PRL) that inhibits angiogenesis in the mouse model of severe antigen-induced arthritis (AIA). However, vasoinhibin may also have proinflammatory effects in the mild AIA model through its interaction with fibroblast-like synoviocytes (FTS). Recently, it was described that the anti-angiogenic domain of vasoinhibin consists of a three amino acid sequence (HGR) located at positions 46 to 48. Hepatapeptides containing this sequence (HGR) in their linear (Vi45-51) and cyclic (CRiVi45-51) forms have been shown to be effective in inhibiting angiogenesis. However, it is not yet known whether Vi45-51 and CRiVi45-51 retain the proinflammatory effects of vasoinhibin. In this study, we investigated whether Vi45-51 and CRiVi45-51 peptides modify inflammatory factor nitric oxide (NO) biosynthesis via inducible nitric oxide synthase (iNOS) in cultured STF. As expected, complete vasoinhibin (used as a positive control) stimulated the expression of iNOS enzyme messenger RNA and protein, as well as NO production in STFs. However, the peptides Vi45-51 and CRiVi45-51 had no such effect. Finally, we evaluated the in-vivo action of CRiVi45-51 in mild and severe AIA models in mice previously immunized by intra-articular administration of 2.5 or 20 μg of the antigen (BSAm, methylated bovine serum albumin), respectively. We found that CRiVi45-51 did not modify joint inflammation in the mild AIA model and reduced it in the severe AIA model along with the expression of proangiogenic mediators (*Vegf*, *Vegf-r2* and *Hif-1 α*). In conclusion, Vi45-51 and CRiVi45-51 peptides could be molecules with a beneficial effect in the treatment of RA, as they retain the beneficial antiangiogenic properties of vasoinhibin and lack its proinflammatory effects. Ongoing studies are evaluating the effect of CRiVi45-51 on vascular density in the severe AIA model and the effect of Vi45-51 on joint inflammation under the same conditions in vivo.



3. Introducción

Las artritis inflamatorias comprenden un grupo de padecimientos que afectan las articulaciones móviles a través de producir inflamación y dolor [1]. Dentro de las artritis inflamatorias, destaca por su prevalencia la AR, una enfermedad inflamatoria progresiva autoinmune con efectos articulares y sistémicos [2-4]. En la AR se genera una respuesta inmune aberrante que promueve la infiltración de células inmunes a la cavidad articular y la proliferación de células locales (sinoviocitos) que resulta en el desarrollo de un frente invasivo e inflamatorio denominado pannus que destruye el cartílago y el hueso [5, 6]. La formación del pannus depende en gran medida de la angiogénesis que facilita la infiltración de células inmunes y permite hacer frente al aumento de las necesidades de oxígeno y nutrimentos derivados de la expansión tisular [7-9]. Debido a que la angiogénesis es esencial para promover el desarrollo y mantenimiento del pannus, los factores antiangiogénicos poseen valor terapéutico en la AR [9]. Uno de estos factores podría ser la vasoinhibina.

La vasoinhibina es una proteína de longitud variable (48 a 159 aminoácidos) que se obtiene de la escisión proteolítica de la PRL, una hormona adenohipofisaria ampliamente reconocida por su efecto estimulante en la producción de leche durante la lactancia [5]. La vasoinhibina, más no la PRL, inhibe la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis [10]. Recientemente se demostró en el modelo de AIA de grave que el tratamiento con vectores génicos que codifican a la vasoinhibina reduce la vascularización del pannus y, por ende, la inflamación y la destrucción del hueso de la articulación [11]. Estos hallazgos apoyan el valor benéfico del tratamiento con la vasoinhibina en la AR. Sin embargo, en el modelo de AIA leve, la vasoinhibina estimula la expresión de mediadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α , e iNOS) a través de sus acciones sobre los STF, células que median reacciones inflamatorias de la articulación [12-14].

Además, el estudio de la vasoinhibina en el tratamiento de la AR se ha visto limitado por las dificultades que presenta su síntesis recombinante. No obstante, estudios recientes localizaron el dominio antiangiogénico de la vasoinhibina en una secuencia de tan solo tres aminoácidos (His46-Gly47-Arg48) [15]. Demostraron que Vi45-51 y CRiVi45-51, heptapéptidos que contienen estos tres aminoácidos, conservan los efectos vasculares y la misma potencia funcional de la vasoinhibina completa [15]. Estos heptapéptidos son solubles, estables y de fácil síntesis (química) lo que podría facilitar su estudio preclínico como análogos de la vasoinhibina (Vi45-51 y CRiVi45-51), pero se desconoce su actividad



sobre la inflamación articular. Dada la importancia de los STF en el proceso inflamación articular, en este estudio se investigó si Vi45-51 y CRiVi45-51 inducen la biosíntesis de NO vía iNOS en cultivos primarios de STF obtenidos de ratones. Además, se evaluó el efecto de CRiVi45-51 en la inflamación articular en el modelo murino de AIA grave y leve.



4. Antecedentes

4.1 Artritis reumatoide

Las articulaciones sinoviales, también conocidas como articulaciones móviles, consisten en estructuras óseas revestidas de cartílago lubricado por el líquido sinovial. Estas articulaciones se encuentran contenidas en una cápsula articular, la cual está recubierta por la membrana sinovial. La arquitectura de las articulaciones sinoviales les permite realizar una amplia variedad de movimientos en condiciones normales. Sin embargo, esta movilidad se ve afectada en condiciones patológicas de inflamación, como las artritis inflamatorias [16]. Las artritis inflamatorias o artropatías inflamatorias representan un grupo de enfermedades caracterizadas por inflamación y dolor articular [1, 17]. Entre las distintas artritis inflamatorias, la artritis reumatoide (AR) se destaca por su alta prevalencia a nivel mundial (1%) y nacional (1.6%) [2, 3]. Esta enfermedad puede desarrollarse en cualquier etapa de la vida, pero su incidencia alcanza su punto máximo entre las edades de la tercera y quinta década [18].

La AR es una patología inflamatoria progresiva autoinmune con efectos articulares y sistémicos, que conllevan a la destrucción del cartílago y el hueso [5]. La etiología de la AR es multifactorial y se considera que es el resultado de la combinación de factores tanto genéticos, ambientales y propios del paciente (estrés, sexo, reproducción) que desencadenan una respuesta inmunitaria anormal [18]. Esta respuesta inmunitaria se caracteriza por la infiltración de diversas células del sistema inmunológico, que incluyen células T y B, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células asesinas naturales (NK), hacia la cavidad articular [18]. Estas células y los tejidos articulares, bajo la influencia del entorno inflamatorio intraarticular, producen de manera exacerbada factores proinflamatorios, como citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y proteasas, así como factores proangiogénicos [19-22].

El ambiente inflamatorio intraarticular favorece la infiltración de células inmunes, estimula la activación y proliferación de células sinoviales residentes (lo que se conoce como sinovitis) y promueve la angiogénesis. Esta expansión de la sinovitis reumatoide, en conjunto con los neovasos y células inmunitarias infiltradas, conduce a la formación del pannus, un frente inflamatorio que invade y destruye la superficie del cartílago y hueso cortical. Las células residentes en el pannus, en particular los STF, generan una variedad de mediadores proinflamatorios y proteasas que contribuyen a la degradación progresiva de la matriz extracelular del cartílago y del hueso [18, 23] (**ver Figura 1**).

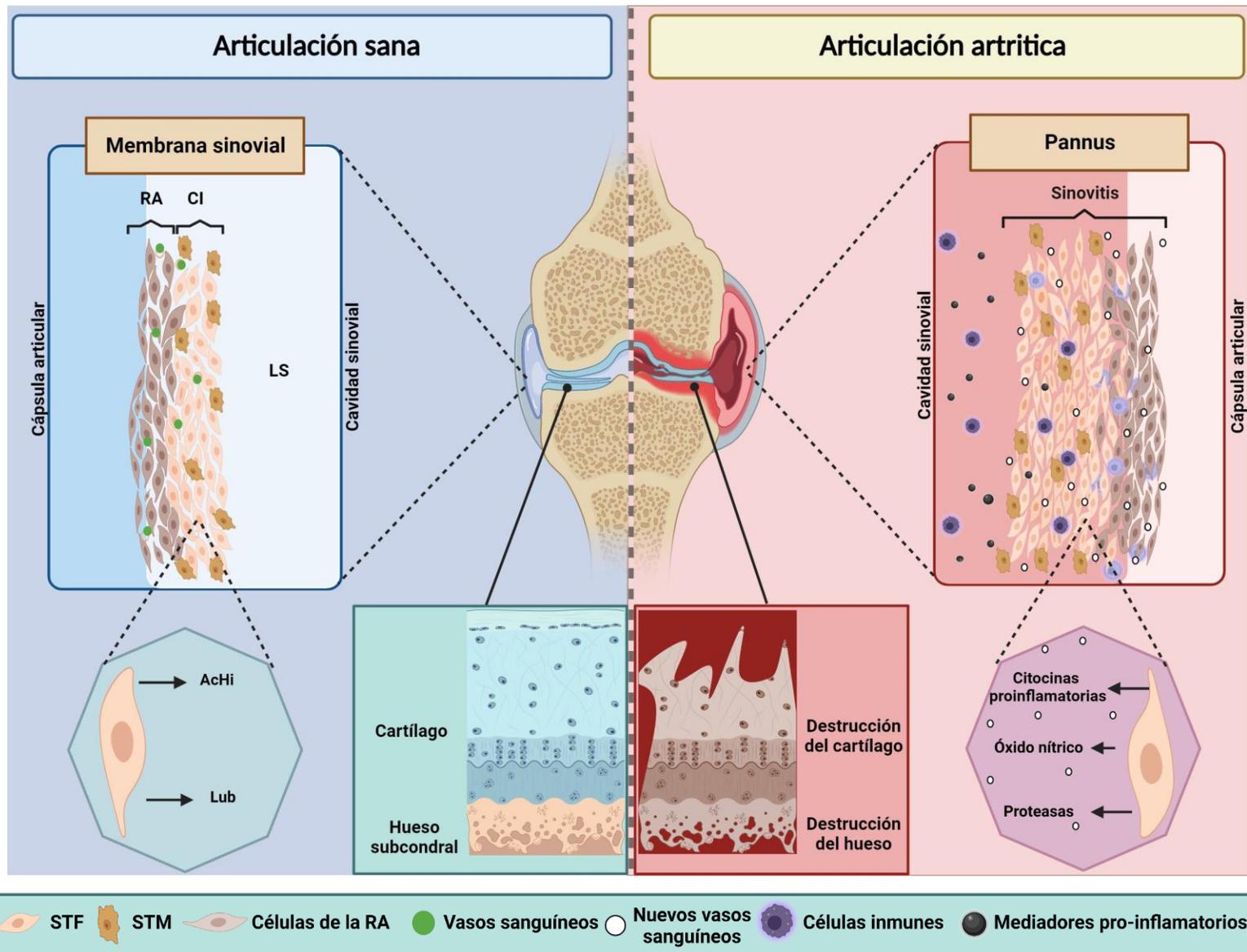




Figura 1. Representación gráfica de la fisiopatología de la artritis reumatoide (AR). Las articulaciones sinoviales están constituidas por huesos recubiertos de cartílago lubricado por el líquido sinovial (**LS**), contenida en una cápsula articular recubierta internamente por la membrana sinovial. La membrana sinovial está formada por dos capas, el revestimiento articular (**RA**) y la capa de la íntima (**CI**). La CI está constituida por los sinoviocitos tipo macrófago (**STM**) y tipo fibroblasto (**STF**). Los STF bajo condiciones fisiológicas normales, son responsables de la biosíntesis de elementos esenciales del LS como el ácido hialurónico (**AChI**) y la lubricina (**Lub**). En la AR se genera una respuesta inmune aberrante que promueve la infiltración de células inmunes a la cavidad articular, la sinovitis y angiogénesis que resulta en el desarrollo de un frente invasivo e inflamatorio denominado pannus, el cual destruye el cartílago y el hueso. Bajos estas condiciones, los STF se activan para producir citocinas proinflamatorias, óxido nítrico, proteasas que amplifican la respuesta inflamatoria y la consecuente destrucción del cartílago y hueso [24-26].

4.2 Sinoviocitos tipo fibroblasto

En la AR, la membrana sinovial se transforma de un tejido sano conformado por dos a tres capas de células de grosor a uno hiperplásico e invasivo. La membrana sinovial, se divide en dos compartimientos anatómicos: la capa del revestimiento articular y la capa más íntima en contacto con la cavidad intraarticular. Esta última, produce el líquido sinovial y se compone de dos tipos celulares, las células sinoviales tipo macrófago (STM) y los STF que son su mayor componente (80%) [16] (**Ver Figura 1**).

Los STF son células de origen mesenquimático y a diferencia de los fibroblastos no sinoviales expresan selectivamente proteínas como la cadherina-11, molécula clave para la adhesión específica entre los STF, la uridina difosfoglucosa deshidrogenasa (UDPGD) que confiere la capacidad de sintetizar ácido hialurónico, la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) que participan la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular y a los propios STF. Este tipo celular además de sintetizar ácido hialurónico produce lubricina, ambos elementos esenciales del líquido sinovial que lubrican y nutren al cartílago avascular [16].

Bajo condiciones de inflamación articular, la membrana sinovial se torna hiperplásica (sinovitis) gracias a la proliferación de los STF y la invasión de células inmunocompetentes como macrófagos, mastocitos, NK, células dendríticas, y linfocitos T y B [18, 27]. Las células inmunocompetentes producen múltiples mediadores proinflamatorios que sobreactivan a los STF [16]. A su vez, los STF activados producen mediadores proinflamatorios [28] como el NO (vía iNOS) [29] y proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP), agrecanasas y captasinas [27] que facilitan la invasión y destrucción del cartílago [30] y el hueso [31]; citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α que autoinducen su



expresión; quimiocinas como la IL-8, la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP)-1 y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1, que atraen leucocitos a la membrana sinovial [24, 28]; así como factores proangiogénicos, entre los que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [28] que promueve la angiogénesis vía acciones directas sobre el endotelio vascular. Por lo tanto, los STF juegan un papel protagónico en el proceso inflamatorio intraarticular durante la AR.

4.3 Inflamación

En la AR se promueve la inflamación gracias a múltiples mediadores proinflamatorios (**Tabla 1**) producidos por diferentes tipos celulares de la articulación [32]. Citocinas proinflamatorias como la IL1 β , IL-6 y el TNF- α y las quimiocinas [33] inducen la biosíntesis de proteasas (catepsina B y captetina L, proteasas de serina [28], MMP1, MMP3, MMP8 y MPP14) responsables de la degradación del cartílago y hueso [27, 34]. Además, las citocinas proinflamatorias inducen la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANKL), responsable de la diferenciación de los osteoclastos. La reabsorción ósea depende de la acción de los osteoclastos [35], de tal manera que el incremento de RANKL vía los osteoclastos conduce a la destrucción del hueso de la articulación durante la AR [27]. Las quimiocinas articulares contribuyen a la formación del pannus a través de estimular la infiltración de células inmunes a la cavidad intraarticular, inducir la activación del fenotipo inflamatorio de células residentes vía la expresión de citocinas proinflamatorias [36] y promover la angiogénesis [28, 37].

Otro mediador proinflamatorio de relevancia en la AR es el NO. La biosíntesis del NO deriva de la reacción catabólica del aminoácido L-Arginina mediada por las óxido nítrico sintasas (NOS) a NO y L-Citrulina. Existen tres isoformas de la NOS, la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) e iNOS. Las dos primeras se expresan de manera constitutiva mientras que la expresión de la iNOS es estimulada por mediadores proinflamatorios como la IL-1 β y el TNF- α [38]. Por tanto, iNOS está asociada con la inflamación, es responsable de la biosíntesis en grandes cantidades (μ M) de NO [38] y se encuentra sobreexpresada en la cavidad intraarticular durante la AR [39]. Altos niveles de NO en el líquido sinovial se han asociado con el grado de destrucción tisular en la articulación artrítica [40] a través de sus acciones oxidantes y la activación de proteasas, entre otros efectos [41].

Los mediadores proinflamatorios también juegan un papel central en la angiogénesis durante la AR a través de acciones directas sobre el endotelio vascular, como por efectos



indirectos promotores de la expresión de factores proangiogénicos por otros tipos celulares de la articulación [42].

Tabla 1. Mediadores proinflamatorios en la articulación con artritis reumatoide.

Clasificación		Factores inflamatorios
Citocinas proinflamatorias	Interleucinas [32]	IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18
	Factor de necrosis tumoral alfa [43]	TNF- α
	Quimiocinas [44]	MCP-1, MIP-1, IL8, RANTES, CXCL2, CCL3, CXCL1, CXCL5, CCL9
	Interferón gamma [45]	IFN- γ
	Factores de crecimiento [46, 47]	PDGF, FGF, TGF β
Otros	Proteasas [28]	Catepsina B y L, MMP-1, MMP-3
	Óxido nítrico [40]	Derivado de iNOS
	Prostaglandinas [28]	COX
	Angiogénicos [42, 48].	VEGF, FGF, Ang1, HIF

MCP-1, proteína quimiotáctica de macrófagos; MIP-1, proteína inflamatoria de macrófagos; RANTES, regulado tras activación, expresado y secretado por células T normales; CXCL, ligando de la quimiocina motivo CXCL; CCL, ligando de la quimiocina del motivo CC; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; TGF, factor de crecimiento transformante; COX, ciclooxigenasa; Ang, angiopoyetina.



4.4 Angiogénesis

La angiogénesis desempeña un papel fundamental para el desarrollo y mantenimiento del pannus en la AR [9]. El aumento en la proliferación de las células de la membrana sinovial y la infiltración de células inmunocompetentes en la cavidad intraarticular [16] aumentan la demanda de oxígeno lo que resulta en un entorno local altamente hipóxico [49] (**Ver Figura 1**). Esta hipoxia, junto con la acción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 y TNF- α) [28], estimula la expresión de factores proangiogénicos como el VEGF que consecuentemente resultará en la angiogénesis [48]. Estos neovasos facilitan la infiltración y supervivencia de células inmunocompetentes (células T, células B, macrófagos, células plasmáticas) [9, 50, 51] así como las células locales (STF y STM). Estas células inmunocompetentes y locales promueven su proliferación y biosíntesis de mediadores proinflamatorios (NO vía iNOS, citocinas proinflamatorias, MMP, entre otros) que conducirán a la destrucción del cartílago y hueso [12, 16, 25, 28, 52-55]. De esta manera, los neovasos potencian la respuesta inflamatoria inicial y la transformación de la membrana sinovial en un frente inflamatorio (pannus) que conduce al daño y destrucción del cartílago y hueso en la articulación artrítica.

Debido a que la angiogénesis es un evento clave en la AR, los factores antiangiogénicos representan una terapia prometedora para su control [9] sin embargo, la farmacología de la AR está enfocada principalmente en el uso de medicamentos antiinflamatorios.

4.5 Farmacología de la artritis reumatoide

Los medicamentos que actualmente se prescriben para el tratamiento de la AR están diseñados para inducir su remisión clínica a través de sus acciones sobre la inflamación. Estos medicamentos se clasifican en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [56-58], glucocorticoides (GC) y aquellos antirreumáticos moduladores de la enfermedad (FARME) que se subclasifican en convencionales, biológicos (anticuerpos humanizados dirigidos contra citocinas proinflamatorias [IL-6 y TNF- α] o sus receptores) y sintéticos dirigidos (que inhiben vías de señalización como la vía Janus Cinasa o JAK_{1/2}) [59].

La EULAR destaca los desafíos en el tratamiento de la AR debido a las severas reacciones a medicamentos (SRAM) a nivel cardiovascular asociados con los AINEs [56-58] y algunos los de los FARMEs [59]. Además los CG pueden generar dependencia farmacológica [56] y tanto los CG [56] como los FARME [60] no logran prevenir brotes recurrentes de la enfermedad (**ver Tabla 2**). Por esta razón, la EULAR subraya la importancia de investigar



moléculas con enfoques terapéuticos innovadores para tratar la AR [56, 59]. Dado que la angiogénesis desempeña un papel fundamental en la AR, el desarrollo de fármacos con propiedades antiangiogénicas es de gran relevancia en la farmacología de la AR.

Se ha informado que fármacos antiangiogénicos autorizados actualmente para tratar diversos tipos de cáncer como el bevacizumab y etanercept (anticuerpos monoclonales humanizados anti-VEGF) [61] reducen la inflamación articular en el modelo de AIA. No obstante, se requieren estudios para evaluar la seguridad de estos fármacos en pacientes con AR [62]. Por sus acciones inhibitorias sobre los vasos sanguíneos, otra molécula antiangiogénica podría ser la vasoinhibina.



Tabla 2. Medicamentos autorizados en el tratamiento de la AR.

Clasificación	Tipo	Mecanismo de acción	Ejemplo	RAM
Convencionales	AINE´s [57, 60]	Inhibidores de la COX, proteína responsable de la síntesis de prostaglandinas.	Aspirina Ibuprofeno Diclofenaco Meloxicam	Efectos gastrointestinales Edema Hepatotoxicidad Nefrotoxicidad Cardiopatías
	Glucocorticoides [56, 58, 63, 64]	Inhibición de la síntesis de mediadores proinflamatorios, entre otros.	Metilprednisolona Prednisona	Cardiopatías Infecciones oportunistas Dependencia farmacológica AR refractaria
FARME [56, 59, 65]	Convencionales [57, 66]	Inhibición de la proliferación celular, entre otros.	Metrotexato Sulfasalazina Fluorocemida Hidroxicloroquina	Hepatotoxicidad Citopenias Neumonitis intestinal AR refractaria
	Biológicos [57]	Anticuerpos humanizados contra citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) e incluso sus receptores.	Infliximab Adalimumab Golimumab Certolizumab Etanercept Tocilizumab Sirukumab Abatacept Sarilumab	Infecciones oportunistas Neoplasias y linfomas malignos Cardiopatías AR refractaria
	Sintéticos dirigidos [67, 68]	Inhibidores de la JAK _{1/2} .	Tofacitinib Baricitinib Peficitinib Upadacitinib Filgotinib	Cardiopatías Infecciones oportunistas Neoplasias malignas



4.6 La vasoinhibina

La vasoinhibina comprende una familia de proteínas derivadas de la escisión proteolítica de la PRL [69], una hormona adenohipofisaria sexualmente dimórfica [70, 71] constituida por 199 aminoácidos que es conocida principalmente por su papel estimulador de la producción de leche en los mamíferos [72]. La escisión proteolítica de la PRL resulta de la acción de proteasas como la catepsina D (CD) [73], la proteína morfogénica de hueso 1 (BMP-1) [74], las MMP [75], la plasmina [76] y la trombina [77].

La vasoinhibina inhibe la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis [10, 78]. Recientemente se demostró que la transferencia génica de vasoinhibina mediante vectores adenoasociados recombinantes reduce la inflamación y la destrucción del hueso a través de inhibir la vascularización del pannus en el modelo de AIA grave en el ratón [11]. Sin embargo, la vasoinhibina también puede actuar como citocina proinflamatoria [14, 79, 80] en la articulación artrítica a través de sus acciones directas sobre los STF al inducir la expresión de genes que codifican mediadores proinflamatorios como la *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, proteasas (*Mmp3*), quimiocinas (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Ccl2*) e *Inos* y la consecuente biosíntesis de NO [29]. Además, se conoce que la vasoinhibina induce la expresión de estos mediadores proinflamatorios vía la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) [29, 79, 80]. El NF- κ B es un factor de transcripción que media el efecto inflamatorio de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β [81]. Estas observaciones indican que la vasoinhibina posee la capacidad tanto de inhibir como de estimular el proceso inflamatorio en la articulación. Esta dualidad sobre la inflamación no es inesperada, ya que se conoce que citocinas proinflamatorias importantes (IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α) también ejercen efectos antiinflamatorios y que mediadores antiinflamatorios clásicos (IL-10, TGF β , GC) poseen acciones proinflamatorias [82, 83]. Se ha propuesto que las acciones duales permiten equilibrar el proceso inflamatorio.

Dada la implicación de la vasoinhibina en el tratamiento de la AR, es importante investigar y comprender sus acciones duales sobre la inflamación de la articulación. Al respecto, se han desarrollado oligopéptidos análogos de la vasoinhibina que conservan sus propiedades antiangiogénicas, pero se desconoce si también comparten los efectos inflamatorios de la vasoinhibina sobre la articulación.



4.7 Vi45-51 y CRiVi45-51, análogos de la vasoinhibina

Como se hizo mención anteriormente, la vasoinhibina deriva de la escisión proteolítica de la PRL. La vasoinhibina inhibe la proliferación de los vasos sanguíneos, mientras que la PRL la induce. Con base a estas observaciones Robles y colaboradores (2020) analizaron por simulación de dinámica molecular el cambio estructural de la PRL al cortarse en vasoinhibina. Esto permitió definir que la región con mayor cambio estructural se encuentra en el primer bucle (L1) de tal manera que se expone una nueva α hélice ($H1_{Vi}$). Se propuso, por tanto, que la región antiangiogénica de la vasoinhibina podría localizarse en la $H1_{Vi}$. La síntesis de péptidos que representan la secuencia de aminoácidos de la $H1_{Vi}$ reveló que tan sólo tres aminoácidos, la histidina (H), glicina (G) y arginina (R) en la posición 46 a 48, poseen la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina (**ver Figura 2**). Además, se mostró que la mutación del dominio HGR en la vasoinhibina resulta en pérdida de su función antiangiogénica [15].

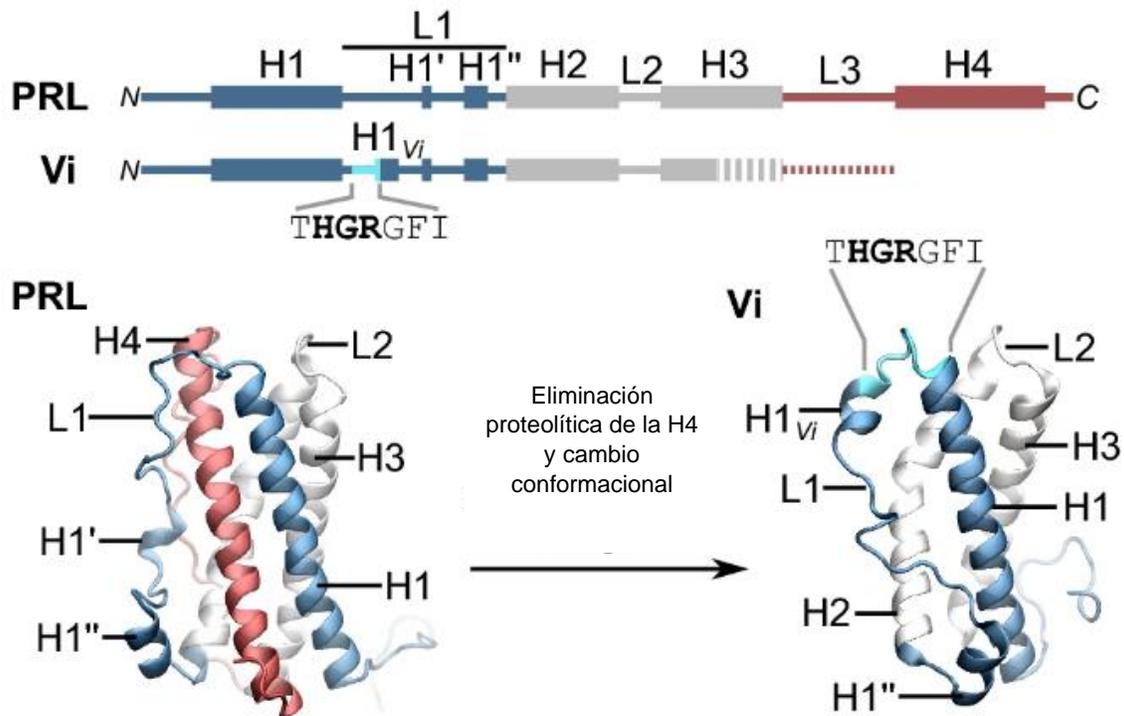


Figura 2. Representación estructural de la escisión proteolítica de la PRL a la Vi. Diagramas de las estructuras secundarias y terciarias de la PRL y vasoinhibina (Vi) que indican las α hélices (H1-4), bucles (L1-3) y residuos 45-51 correspondientes a la secuencia THGRGFI. La Vi se origina cuando la H4 se elimina mediante proteólisis lo que provoca cambios conformacionales en L1, exponiendo de tal manera una nueva hélice α ($H1_{Vi}$) [15].



Con el objetivo de optimizar la secuencia de HGR, se realizó la síntesis de heptapeptidos que comprenden los aminoácidos 45 al 51 de la vasoinhibina íntegra en su forma lineal, Vi45-51 y la secuencia cíclica en sentido inverso, CRiVi45-51 (**ver Figura 3**). Cabe mencionar que Vi45-51 y CRiVi45-51 conservan las propiedades vasculares y la misma potencia que la vasoinhibina íntegra y CRiVi45-51 es resistente a su degradación por acción de proteasas endógenas, de tal manera que puede ser administrado por vía oral.

Por lo tanto, se cuenta con un análogo lineal y uno cíclico de la vasoinhibina, solubles, estables y de fácil síntesis (química) con posibles implicaciones benéficas en el tratamiento de enfermedades angiogénesis-dependientes como la AR.

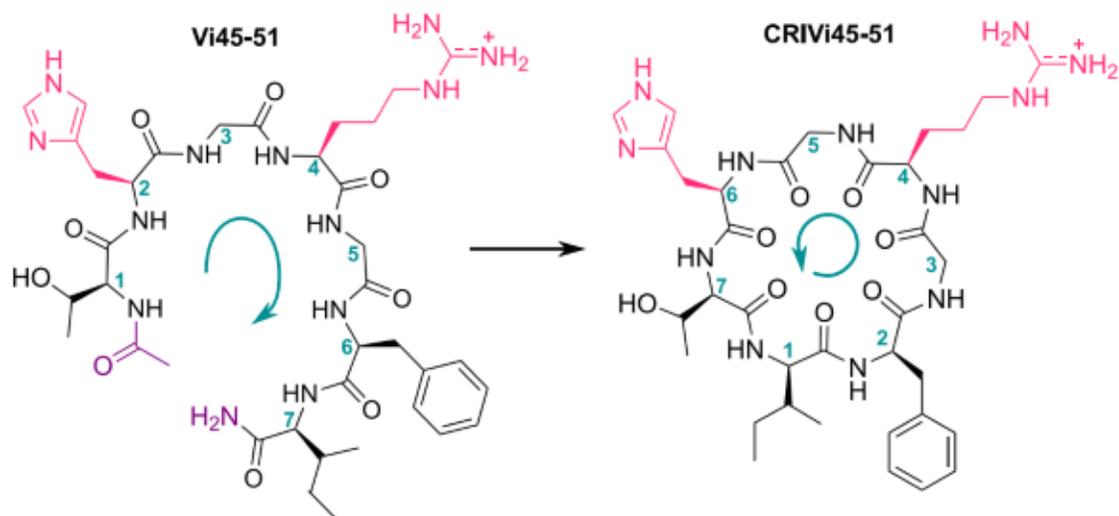


Figura 3. Representación estructural de Vi45-51 y CRiVi45-51. Vi45-51 se compone de L-aminoácidos mientras CRiVi45-51 de D-aminoácidos en orden inverso. Los números indican los α -carbonos y las flechas verdes el sentido de síntesis [15].

El desarrollo de Vi45-51 y CRiVi45-51 podría tener relevancia para la futura traslación a la clínica de la vasoinhibina. Las isoformas endógenas de la vasoinhibina poseen longitudes variables que oscilan entre los primeros 48 a 159 aminoácidos de la molécula. La síntesis recombinante de la vasoinhibina es de baja eficiencia y efectividad debido principalmente a modificaciones postraduccionales que interfieren con su actividad biológica como la glicosilación y la agregación [84]. Recientemente, se descubrió que la trombina genera a la vasoinhibina de 48 aminoácidos, la más pequeña que se conoce [77]. Dado que la trombina desempeña un papel fundamental en los procesos de reparación tisular ligados a la



inflamación [85], es posible que Vi45-51 y CRiVi45-51 también posean acciones proinflamatorias.

En este estudio, se investigó si Vi45-51 y CRiVi45-51 conservan el efecto inflamatorio de la vasoinhibina en los cultivos de STF. Los resultados obtenidos indican que la vasoinhibina convencional (compuesta por 123 aminoácidos), pero no Vi45-51 y CRiVi45-51, estimula la biosíntesis de NO a través de iNOS. En concordancia con estos hallazgos, se observó que la administración in vivo de CRiVi45-51 en el modelo de AIA leve no modificó la inflamación articular. Sin embargo, en el modelo de AIA grave CRiVi45-51 disminuyó la inflamación articular en conjunto con la expresión de mediadores proangiogénicos. Estos resultados respaldan la ausencia de efecto proinflamatorio de Vi45-51 y CRiVi45-51 en los STF y el efecto benéfico de CRiVi45-51 para el tratamiento de la artritis. Por último, este trabajo sustenta el desarrollo de los estudios preclínicos ante la necesidad de conocer aspectos de seguridad, eficiencia y calidad de Vi45-51 y CRiVi45-51 para futuros estudios de fase clínica.



5. Hipótesis

- Vi45-51 y CRiVi45-51 son proinflamatorios sobre los STF y CRiVi45-51 tiene los efectos duales de la vasoinhibina en el modelo de AIA.

6. Objetivos

6.1 General

- Determinar el efecto de Vi45-51 y CRiVi45-51 sobre la expresión de iNOS y la biosíntesis de NO en cultivos de STF y el efecto de CRiVi45-51 sobre la inflamación articular en el modelo de AIA en el ratón.

6.2 Específicos

- 1) Evaluar el efecto de Vi45-51 y CRiVi45-51 sobre la expresión de iNOS y la biosíntesis de NO en cultivos de STF.
- 2) Determinar el efecto de CRiVi45-51 sobre la inflamación articular en el modelo de AIA leve.
- 3) Evaluar el efecto de CRiVi45-51 sobre la inflamación articular en el modelo de AIA grave.



7. Metodología

7.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6J machos que se obtuvieron y mantuvieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro. Los ratones se mantienen de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [86] y todos los experimentos fueron aprobados 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 de CO₂ al 20%.

7.2 Cultivos de sinoviocitos tipo fibroblasto

La extracción de los STF se realizó a partir de ratones C57BL/6J de 4 a 6 semanas de edad y con base al protocolo establecido por Zhao, J. *et al.* [87]. La articulación fémur /fíbula / tibia de las extremidades posteriores se lavaron en solución salina Hank balanceada con antibióticos (250 µl de gentamicina [10 mg/mL; Gibco by life technologies, Grand Island, NY]) y fungicida (50 µl de anfotericina B [250 µg/mL; Gibco by life technologies, Grand Island, NY]). La piel, músculo y tendones se removieron por microdissección, teniendo cuidado de no romper el hueso. Las articulaciones con hueso dañado se eliminaron del proceso de aislamiento para prevenir la contaminación del cultivo de STF con células de la médula ósea. La membrana sinovial se expuso 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 / estreptomina (Invitrogen), 2 mg/mL de colagenasa tipo IV (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) y 0.2 mg de desoxirribonucleica 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37 °C por 3 h bajo agitación (300 rpm). El extracto se filtró a través de un poro de 100 µm y el paquete celular obtenido mediante centrifugación (25 RFC / 37 °C) se resuspendió en DMEM 20 % SFB y cultivó en placas de 6 pozos bajo una atmósfera de 5 % dióxido de carbono (CO₂) a 37 °C. Una vez alcanzada la confluencia, se realizó el primer pase (P1), para lo cual se retiró el medio de cultivo y se añadió tripsina (Gibco, Grand Island, NY) y las células se suspendieron en DMEM 20 % SFB. Este proceso



se repitió dos veces más y los cultivos resultantes (P3), enriquecidos en STF, se utilizaron para los distintos experimentos.

7.2.1 Tratamiento

Los cultivos de STF (500,000 células por pozo en placas de 12 pozos) fueron tratados con una preparación estándar de la vasoinhibina recombinante de 123 aminoácidos (Vi, control positivo, 100 nM), los aminoácidos 45-51 de la vasoinhibina en secuencia al azar (scrambled, control negativo, 100 nM) y diferentes concentraciones de Vi45-51, CRiVi45-51 (50, 100, 200 nM) en medio de cultivo DMEM 1 % SFB por 24 h. Posteriormente se realizó la extracción de ARN, proteína o medios condicionados para la cuantificación de NO.

7.3 Inducción del modelo de AIA grave y leve

El modelo de AIA se indujo en ratones C57BL/6J de 8 a 10 semanas de edad (20 - 25 g) con base al método reportado por Brackertz, D. (1997) [88]. Los ratones fueron inmunizados a través de la administración intradérmica de 40 μ l de la emulsión 1:1 del antígeno ASBm (albúmina sérica bovina metilada, 10 μ g / μ l [Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA]) y el adyuvante completo de Freud (CFA, 5 μ g / μ l [Difco Laboratories, Detroit, MI, USA]) en los días 21 y 14 previos a la inducción de la artritis (día -21 & -14). Para potenciar la respuesta inmunológica y en paralelo a la administración intradérmica, se administró vía intraperitoneal (IP) 10 μ l de toxina pertussis (10 ng / μ l, Sigma Aldrich). En el día cero, se inyectaron vía intraarticular 10 μ l de solución salina fisiológica (SSF) conteniendo 2.5 o 20 μ g del ASBm para el modelo grave y leve de artritis, respectivamente. La inflamación articular se determinó mediante la medición de la circunferencia articular monitoreada doble ciego cada dos días (día -1, 1, 3, 5). Esta medición se realizó con una cinta, que se posicionó a la altura de la rodilla.

En el día 6 se practicó la eutanasia de los ratones a través de exposición a una atmósfera saturada de CO₂ y decapitación. Se obtuvieron las articulaciones y de manera aleatoria se dispusieron para su análisis histológico o expresión de genes (**ver Figura 3**).

7.3.1 Tratamiento

Los ratones fueron tratados cada 12 h con vehículo (SSF) o CRiVi45-51 (2 mg / kg cada 12 h) vía IP a partir del día -1 al día 5 (**ver Figura 3**). En el presente estudio, los ratones no fueron tratados con Vi45-51 debido a restricciones en los plazos experimentales.

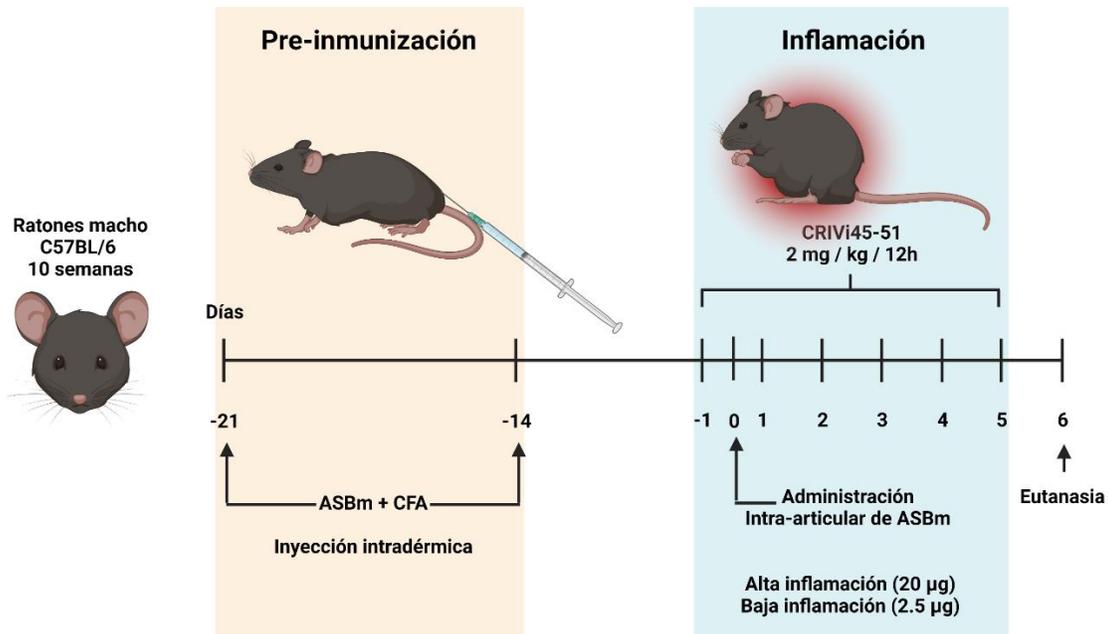


Figura 4. Representación gráfica del modelo de AIA grave y leve en ratones C57BL/6J.

7.4 Expresión de genes por qRT-PCR

Se homogenizaron los cultivos de STF o el pulverizado de las articulaciones congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (100 mg) con 0.5 o 1 mL de TRIzol, respectivamente. Posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras se centrifugaron (1800 RFC por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se recuperó la fase acuosa. Inmediatamente se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico seguido de una agitación vigorosa y una incubación por 24 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente la muestra se centrifugó (1800 RFC / 20 min), el pellet se lavó con etanol (70 %, 0.5 mL), se centrifugó y decantó teniendo cuidado de preservar todo el precipitado, el cual se dejó secar y se adicionó con 45 µl de agua libre de nucleasas. El ARN se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN total mediante la enzima transcriptasa reversa, desoxinucleótidos, oligonucleótidos y agua libre de nucleasas utilizando el estuche de alta capacidad de retro-transcripción según especificaciones del fabricante (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Con base a la concentración de RNA determinada de cada muestra, se consideró que 1 ng de RNA equivale a 1 ng de ADNc sintetizado, con base a este dato el ADNc se diluyó con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 10 ng/ µl y se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



La amplificación de los transcritos en qRT-PCR se realizó en una mezcla de reacción conteniendo Máxima[®] SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Auburn, CA, USA) y el oligonucleótido correspondiente (**ver Tabla 3**). Se consideró como gen constitutivo el *Hprt* [89, 90].

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados.

Gen	Forward	Reverse
<i>Hprt</i>	5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3'	5'-GTTGAGAGATCATCTCCACC-3'
<i>Inos</i>	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'	5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
<i>Vegf</i>	5'-CGCGAGTCTGTGTTTTTGTGCA-3'	5'-CAGAGCGGAGAAAGCATTGT-3'
<i>Vegf-r2</i>	5'-GCCCTGCCTGTGGTCTCACTAC-3'	5'-CAAAGCATTGCCCATTCGAT-3'
<i>Hif-1α</i>	5'-ACAAGTCACCACAGGACAG-3'	5'-AGGGAGAAAATCAAGTCG-3'

7.5 Western blot

Se realizó la extracción de proteína a partir de cultivos de STF con 80 μ l de amortiguador de lisis 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 cantidad de proteína a través del método espectrofotométrico 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 desnaturizantes (SDS-PAGE) y Western blot. La separación de proteínas se realizó por electroforesis (120 V durante 3 h) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante 45 min a 23 V. Las membranas se bloquearon con 5 % de leche y posteriormente se incubaron overnight con los anticuerpos primarios Anti-iNOS (1:250; AB150171; EMD Milipore, 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 el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc).

7.6 Cuantificación de óxido nítrico

La cuantificación de NO de los medios condicionados de cultivos de STF se realizó indirectamente con la reacción de Griess de acuerdo al método reportado [79]. Se agregaron 75 μ l de solución enzimática (50 μ l nitrato reductasa *Aspergillus species*, 125 μ l HEPES pH 7.4, 1,250 μ l NADPH, 450 μ l H₂O) 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 1 h. Posteriormente a las muestras se les agregó 25 µl de ferricianuro de potasio 8 mM y se incubó a temperatura ambiente por 25 min. Se tomaron 100 µl de la solución de reacción y se transfirieron a una placa de ELISA a la cual se le añadió 100 µl de la solución de Griess (0.1 g sulfanilamida; 0.01 g naftiletildiamina [NEDA] y 2.9 mL ácido fosfórico concentrado en condiciones de oscuridad en un volumen final de 10 mL en H₂O). Para la cuantificación, las muestras se leyeron por espectrofotometría a 543 nm y se calculó la concentración micromolar de nitratos y nitritos de las muestras por el método de mínimos cuadrados.

7.7 Histología de la articulación. Cuantificación del área del pannus

Las articulaciones de la rodilla se fijaron en formalina tamponada al 10 % durante dos días a temperatura ambiente seguido de la descalcificación con EDTA al 14 % (pH 7.0) durante 14 días a 37 °C. Las articulaciones fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de la articulación fémur / tibia del ratón (5 µm de espesor) que se tiñeron con una solución de hematoxilina – eosina de Harris para evaluar el área de pannus. El área de pannus se cuantificó en relación a un área fija de la articulación usando el software de análisis Image – Pro plus (versión 7, Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA).

7.8 Análisis estadístico

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 consideraron significativas para $p < 0.05$.



8. Resultados

8.1 La expresión génica de *Inos* no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51

Cultivos enriquecidos en STF fueron tratados con o sin 100 nM de vasoinhbina o la secuencia scrambled, y concentraciones crecientes (50, 100, y 200 nM) de Vi45-51 y CRiVi45-51. Determinamos el nivel de expresión del gen *Inos* por qRT-PCR normalizado con el gen constitutivo *Hprt*. Observamos que la vasoinhbina íntegra induce de manera significativa la expresión de *Inos*, pero no la secuencia scrambled ni las diferentes concentraciones de Vi45-51 o CRiVi45-51 (Ver Figura 5).

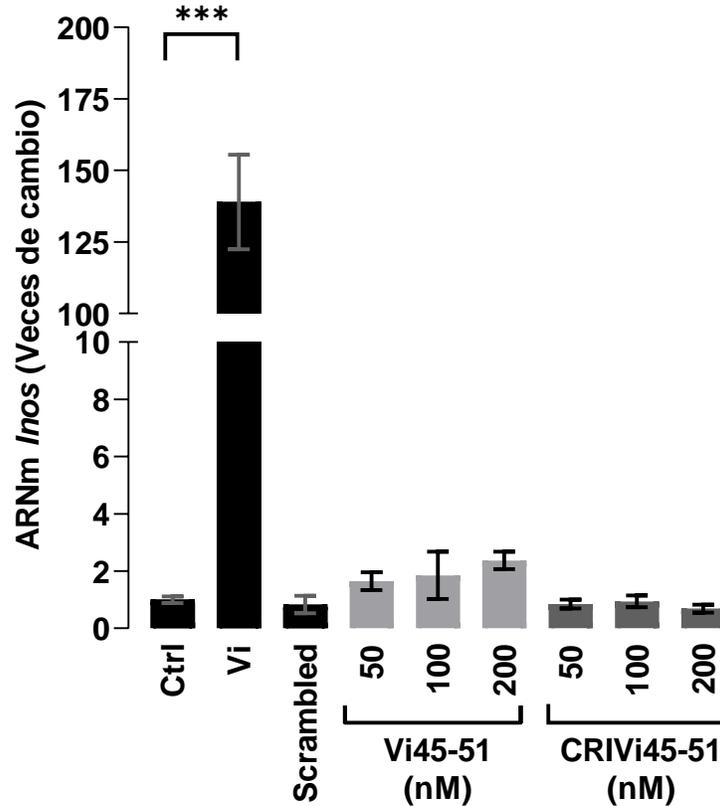


Figura 5. La expresión génica de *Inos* no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51. Niveles de expresión de *Inos* en STF incubados sin (control, Ctrl) o con 100 nM de vasoinhbina (Vi), 100 nM de la secuencia scrambled y diferentes concentraciones de Vi45-51 o CRiVi45-51. El nivel de expresión se normalizó con respecto al gen constitutivo (*Hprt*) y se expresó con respecto al control no tratado. Los resultados corresponden a la media \pm EE de triplicados independientes de un experimento representativo. *** $p < 0.0001$. $n = 3$.



8.2 La proteína iNOS no aumento por Vi45-51 o CRiVi45-51

Con base a los resultados anteriores, se demostró que Vi45-51 y CRVi45-51 no inducen la expresión del ARNm de iNOS, procedimos a analizar si este resultado se observa a nivel de la proteína evaluada por Western blot. Observamos que únicamente la vasoinhbina aumenta los niveles de iNOS, pero no la Vi45-51 y el CRiVi45-51 (Ver Figura 6).

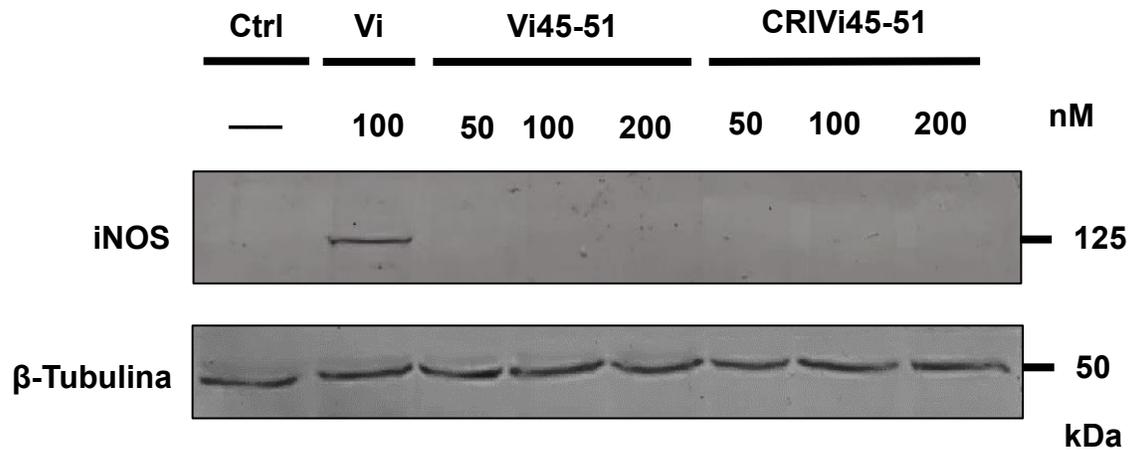


Figura 6. La proteína iNOS no aumento por Vi45-51 o CRiVi45-51. Análisis por Western blot del nivel de expresión de la proteína iNOS y β-Tubulina como control de carga en cultivos de STF tratados con o sin vasoinhbina recombinante (Vi) o concentraciones crecientes (50, 100, 200 nM) de Vi45-51 o CRiVi45-51.



8.3 La biosíntesis de NO no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51

Para corroborar la ausencia de efecto de Vi45-51 y CRiVi45-51 sobre iNOS, evaluamos la biosíntesis de NO en cultivos enriquecidos de STF tratados con o sin 100 nM de la vasoinhibina, diferentes concentraciones de Vi45-51 o CRiVi45-51 (50, 100, 200 nM). El NO es un mediador proinflamatorio con un tiempo de vida media corto (3-6 segundos) [91] por lo que su concentración se determina indirectamente a través de cuantificar sus metabolitos estables (nitratos [NO₃⁻] y nitritos [NO₂⁻]) con la reacción de Griess. Como se esperaba, la vasoinhibina íntegra indujo la biosíntesis de NO, mientras que Vi45-51 o CRiVi45-51 no tuvieron ningún efecto (**Ver Figura 7**).

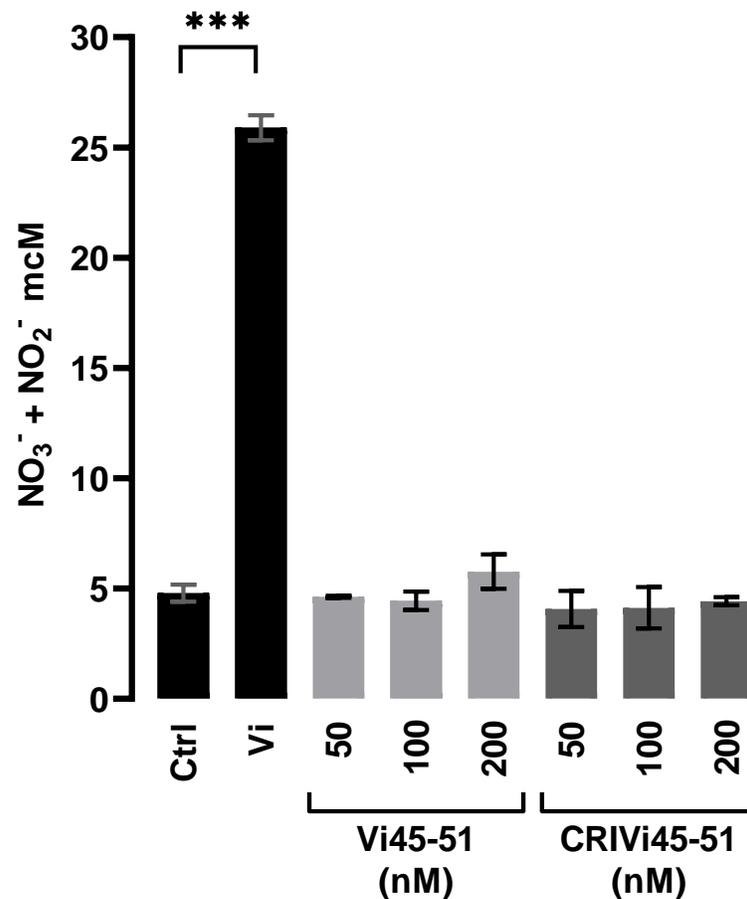
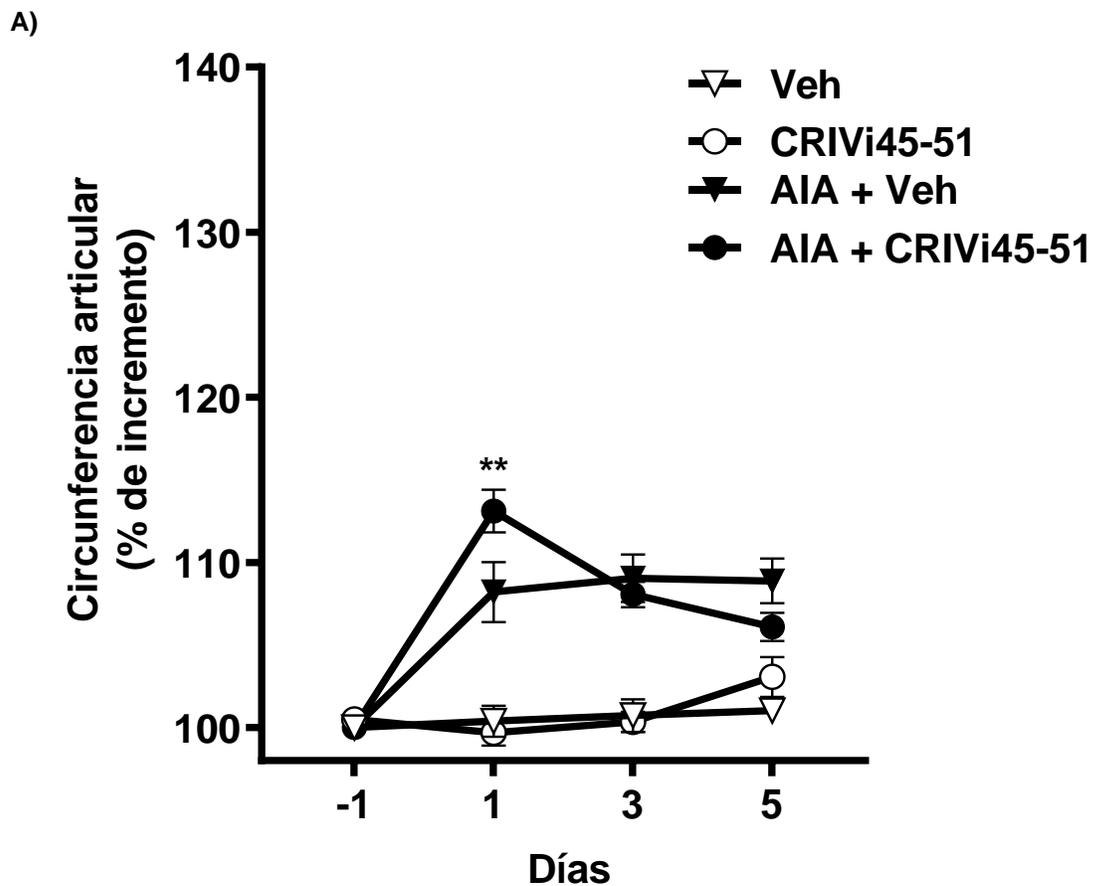


Figura 7. La biosíntesis de NO no fue inducida por Vi45-51 o CRiVi45-51. Cuantificación de NO a través de los metabolitos estables nitratos [NO₃⁻] y nitritos [NO₂⁻] por la reacción de Griess en cultivos de STF incubados en ausencia (Ctrl) o presencia de 100 nM de la vasoinhibina (Vi), Vi45-51 o CRiVi45-51. Los resultados corresponden a la media ± EE de triplicados independientes de un experimento. ***p < 0.0001; n = 3.



8.4 En el modelo de AIA leve CRIVi45-51 no modificó la inflamación articular

Para poner en manifiesto el posible efecto proinflamatorio de CRIVi45-51 sobre la articulación artrítica, se indujo el modelo de AIA leve en ratones C57BL/6 machos de 8 a 10 semanas de edad a través de la administración intraarticular de 2.5 μ g de ASBm. Los ratones fueron inyectados vía IP con CRIVi45-51 (2 mg / kg cada 12 h) a partir del día -1 al 5. En los ratones artríticos tratados con CRIVi45-51 se observó un modesto aumento en la circunferencia articular únicamente en el día 1, pero no después (**Figura 8A**). El análisis histológico confirmó una enfermedad articular modesta caracterizada por una inflamación sinovial (pannus) leve (**Figura 8B**). CRIVi45-51 mostró una tendencia no significativa a disminuir el área del pannus de los ratones artríticos al día 5 (**Figura 8C**).



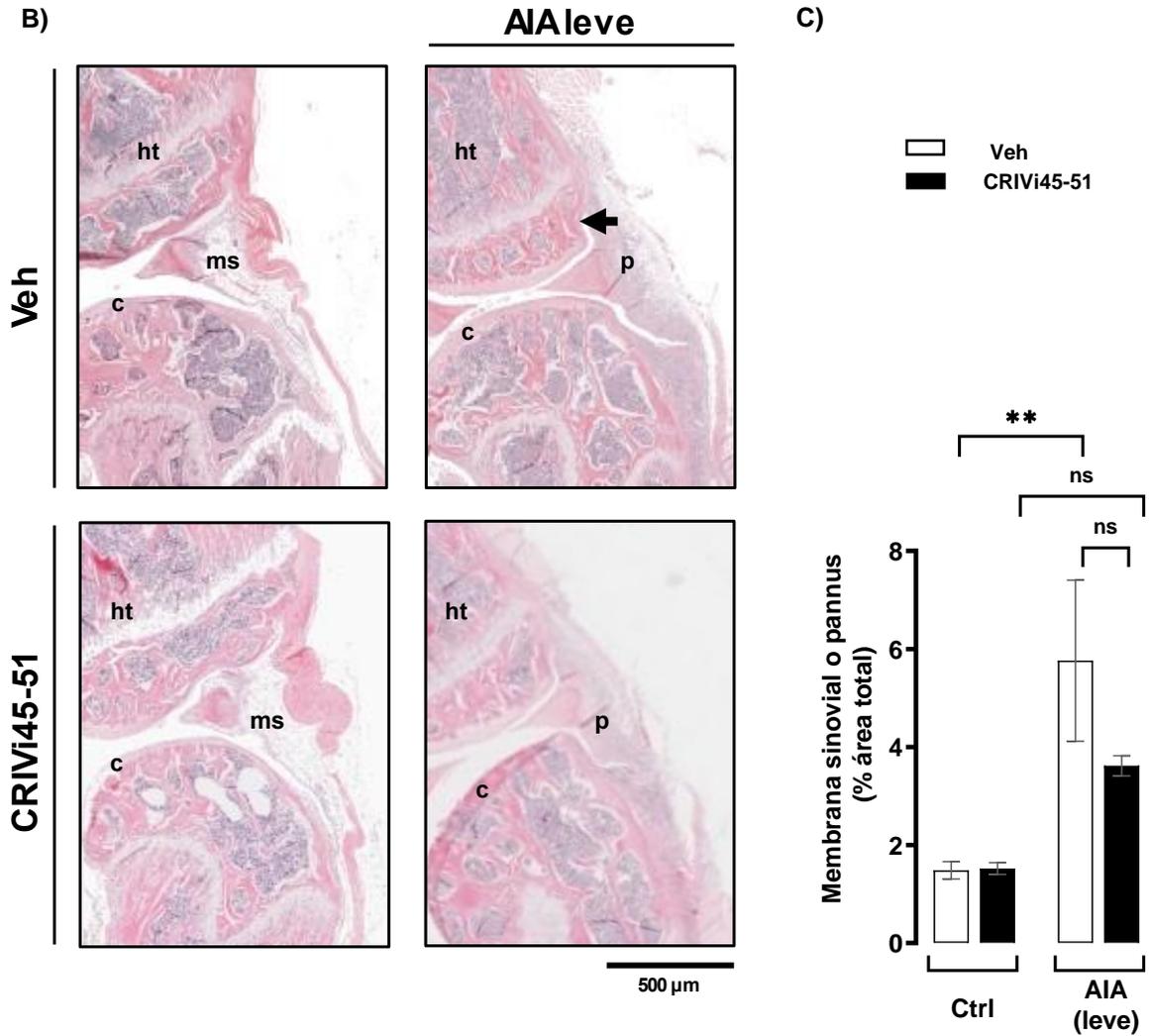


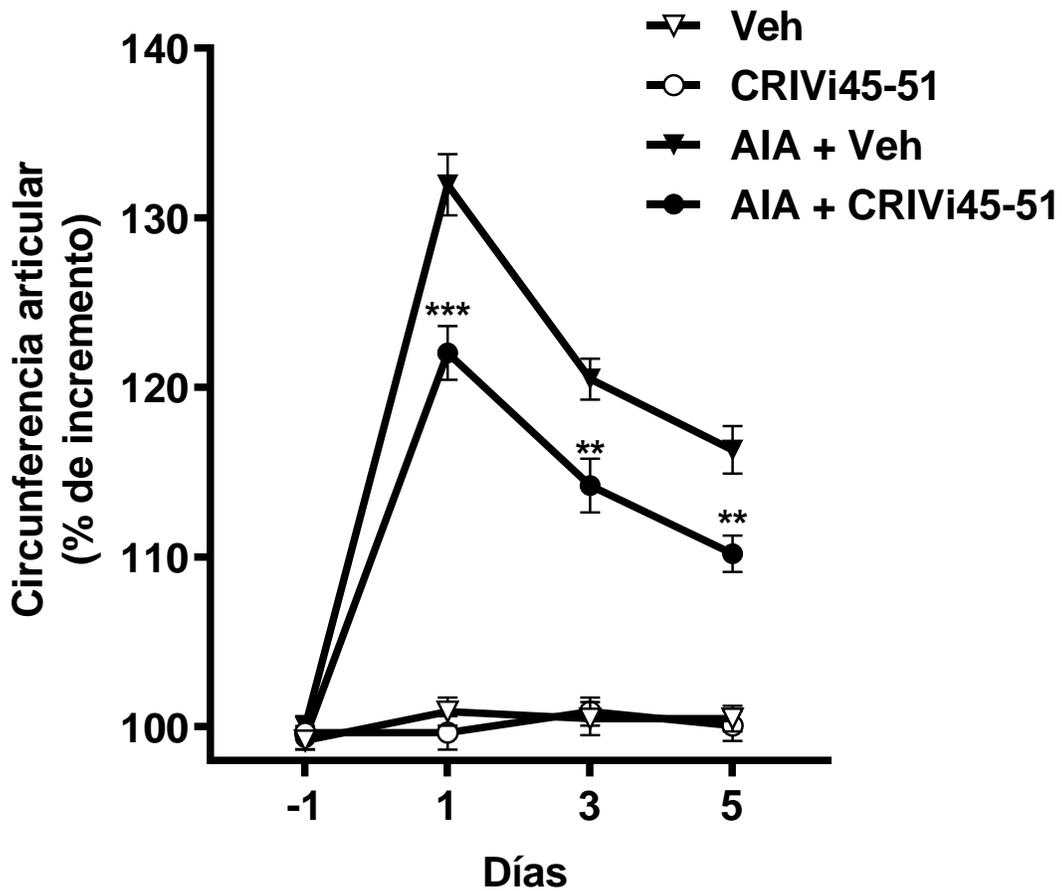
Figura 8. En el modelo de AIA leve, CRIVi45-51 no modificó la inflamación articular. A) Evolución temporal de la inflamación de la rodilla evaluada a través de la medición de la circunferencia de la rodilla en los días -1, 1, 3 y 5. **B)** Micrografías representativas de la articulación de la rodilla de ratones control y AIA leve tratados con o sin CRIVi45-51 teñidas con hematoxina-eosina. **C)** Las barras muestran el área de la membrana sinovial (control) o pannus en relación con un área fija de la articulación de la rodilla. c: cartílago, ht: hueso trabecular; ms: membrana sinovial, p: pannus, las flechas hacen referencia a daño tisular sobre el cartílago o hueso. Los valores son la media \pm EE de 6 a 12 articulaciones. ** $p < 0.001$; ns: no significativo.



8.5 En el modelo de AIA grave CRIVi45-51 disminuyó la inflamación articular

Se indujo el modelo de AIA grave en ratones C57BL/6 machos sanos de 8 a 10 semanas de edad a través de la inyección intraarticular de 20 μ g de ASBm. Los ratones fueron administrados vía IP con CRIVi45-51 (2 mg / kg / 12 h) a partir del día -1 al 5. CRIVi45-51 redujo la inflamación articular en los ratones artríticos y no la modificó en los animales sanos (**Figura 9A**). El análisis histológico de la articulación del modelo grave mostró una inflamación marcada caracterizada por una formación extensa del pannus en comparación con la articulación sana (**Figura 9B**). El incremento en la formación del pannus bajo la condición de AIA grave se redujo por efecto de CRIVi45-51 (**Figura 9B**) y esta diferencia fue significativa cuando se cuantificó el área del pannus con respecto al área de la articulación (**Figura 9C**).

A)



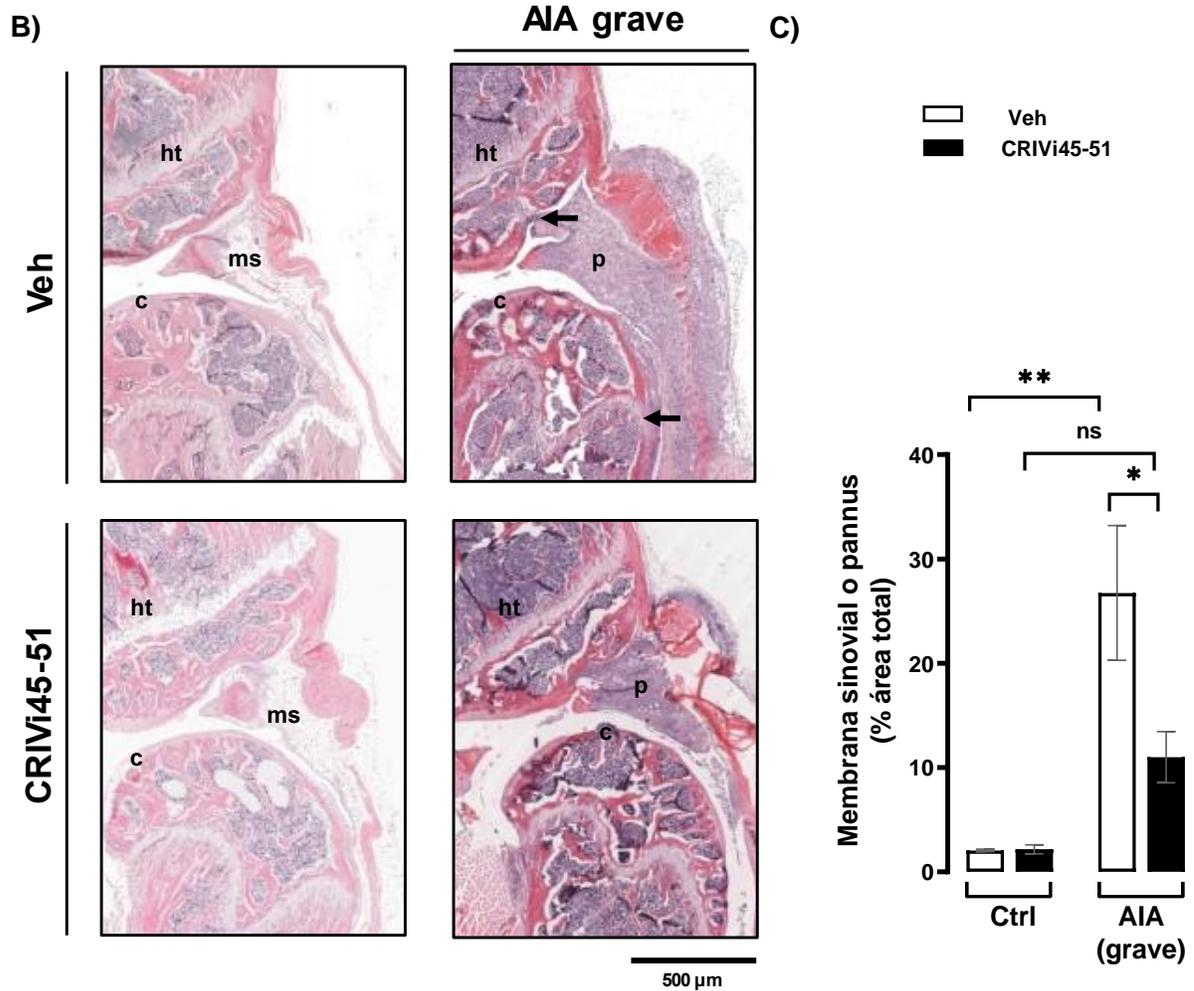


Figura 9. En el modelo de AIA grave CRIVI45-51 disminuyó la inflamación articular. A) Evolución temporal de la inflamación de la rodilla evaluada a través de la medición de la circunferencia de la rodilla en los días -1, 1, 3 y 5. **B)** Micrografías representativas de la articulación de la rodilla de ratones control y AIA grave tratados con o sin CRIVI45-51 teñidas con hematoxilina-eosina. **C)** Las barras muestran el área de la membrana sinovial (control) o pannus en relación con un área fija de la articulación de la rodilla. c: cartílago, ht: hueso trabecular; ms: membrana sinovial, p: pannus, las flechas hacen referencia a daño tisular sobre el cartílago o hueso. Los resultados corresponden a la media \pm EE de 6 a 12 articulaciones. ** $p < 0.001$; * $p < 0.01$; ns: no significativo.



8.6 En el modelo de AIA grave CRIVi45-51 disminuyó la expresión de genes asociados a la angiogénesis

Se analizó el nivel de expresión de genes que codifican a factores asociados a la angiogénesis (*Vegf*, *Vegf-r2* y el *Hif-1 α*) en las articulaciones de ratones sin y con AIA grave tratados o no con CRIVi45-51. Bajo condiciones artríticas control se observó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de *Vegf*, *Vegf-r2* y *Hif-1 α* , sin embargo, en aquellos ratones artríticos tratados con CRIVi45-51 se disminuyó significativamente (**Figura 10**).

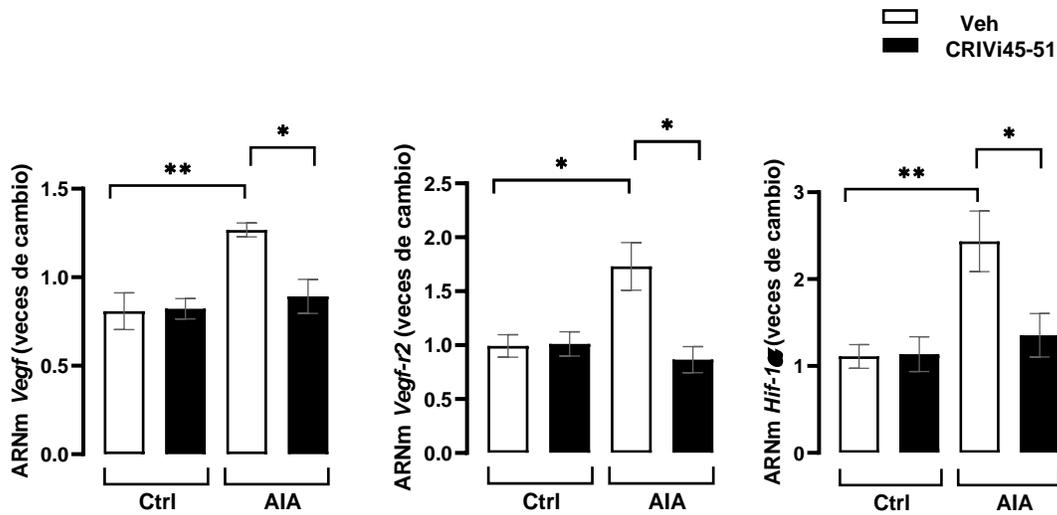


Figura 10. En el modelo de AIA grave CRIVi45-51 disminuyó la expresión de genes asociados a la angiogénesis. Cuantificación por qRT-PCR de los niveles de expresión de *Vegf*, *Vegf-r2* y *Hif-1 α* en las articulaciones de ratones con o sin AIA grave tratados con o sin CRIVi45-51 (2 mg / kg /12 h; IP). El nivel de expresión se normalizó con respecto al gen constitutivo *Hprt* y se expresó respecto al control no tratado. Los resultados corresponden a la media \pm EE de 6 a 12 articulaciones. **p < 0.001; *p < 0.01.



9. Discusión

La AR es una enfermedad autoinmune crónico-inflamatoria dependiente de la angiogénesis [92, 93]. En la AR, la hiperplasia de células sinoviales locales (fundamentalmente STF) y la infiltración de células inmunocompetentes conforma un frente inflamatorio (pannus) que destruye el cartílago y hueso de la articulación [19-22]. La alta densidad celular genera un ambiente hipóxico que promueve la expresión de factores proangiogénicos que conducen a la neovascularización del pannus [48, 49]. Los neovasos nutren y oxigenan el tejido inflamado permitiendo su crecimiento y supervivencia; además los neovasos son altamente permeables lo que promueve aún más la infiltración de células inmunes a la cavidad articular amplificándose la señal proinflamatoria, la hiperplasia y la expansión del pannus [9, 16]. Debido a su papel determinante, la inhibición de la angiogénesis representa una estrategia terapéutica prometedora para el control de la AR.

Experimentalmente se ha demostrado que la administración de moléculas con acción antiangiogénica [94] como vectores recombinantes que codifican a la angiostatina [95] y fármacos antiangiogénicos como el bevacizumab y etanercept (anticuerpos monoclonales humanizados anti-VEGF) [61] reducen la inflamación articular en modelos de artritis. Sin embargo, a pesar de la creciente evidencia de la importancia de la angiogénesis en la AR, el desarrollo de moléculas antiangiogénicas para el tratamiento de la patología, es aún escaso [96]. La vasoinhibina podría representar una de estas moléculas por sus acciones inhibitorias sobre los vasos sanguíneos [11].

Es importante destacar que en el modelo de AIA grave se demostró experimentalmente que el tratamiento con vectores génicos derivados de virus adenoasociados que codifican a la vasoinhibina de 123 aminoácidos, disminuyó la inflamación articular. Este efecto de la vasoinhibina se debe a su efecto inhibitorio sobre la vasopermeabilidad y la vascularización del pannus, lo que redujo la infiltración de células inmunológicas, la expresión de mediadores de inflamación y la destrucción del hueso en la articulación artrítica. Estos resultados son de relevancia dado que apoya el uso de la vasoinhibina en el tratamiento de la AR [11]. Sin embargo, la vasoinhibina también tiene efectos proinflamatorios en la artritis [29].

Recientemente Ortiz y colaboradores (2022) describieron el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina en el modelo de AIA leve [29]. Se observó que el tratamiento con vectores de expresión génica a vasoinhibina aumentó la inflamación y la expresión de mediadores



proinflamatorios en la articulación artrítica. El efecto proinflamatorio de la vasoinhibina en la articulación artrítica involucra a los STF. En cultivos de STF la vasoinhibina indujo la activación de la vía del NF- κ B y consecuentemente la expresión de mediadores inflamatorios (*Il1b*, *Il-6*, *Inos* y *Tnfa*) y la biosíntesis de NO [29]. Los efectos duales de la vasoinhibina sobre la inflamación articular ilustran la complejidad del proceso inflamatorio en la articulación y expone la necesidad de entender los mecanismos involucrados. Por último, con base a estas observaciones, el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina sobre la inflamación articular obstaculiza su uso en el tratamiento de la AR.

El análisis estructural por simulación de dinámica molecular permitió definir que el dominio antiangiogénico de la vasoinhibina está constituido por tan sólo tres aminoácidos: His46-Gly47-Arg48 (HGR). Esto condujo a la síntesis de heptapéptidos que comprenden los aminoácidos 45 al 51 de la vasoinhibina en la forma Vi45-51 y CRiVi45-51. Cabe mencionar que estas moléculas mantienen el efecto inhibitorio sobre los vasos sanguíneos y potencia de la vasoinhibina. Además, son notablemente más estables y su síntesis (química) es más sencilla, lo que podría convertirlas en una innovadora opción para el tratamiento vía angiogénesis de la artritis [15]. Sin embargo, se desconocía si Vi45-51 y CRiVi45-51 conservan los efectos proinflamatorios de la vasoinhibina. Gracias al trabajo del presente estudio, demostramos la ausencia de efecto proinflamatorio de Vi45-51 y CRiVi45-51 en cultivos de STF y evidenciamos que CRiVi45-51 no modifica la inflamación articular en el modelo de AIA leve y la disminuye en el modelo de AIA grave.

Nuestro trabajo corroboró el efecto proinflamatorio de la vasoinhibina completa sobre la biosíntesis de NO vía la expresión de la iNOS en cultivos de STF [29]. El NO producido por la iNOS es un potente promotor de la inflamación, su concentración se encuentra elevada en la circulación y en el líquido sinovial de pacientes con AR y se ha asociado con el grado de destrucción de la articulación [22, 40, 97]. Cuando se produce en grandes cantidades, el NO promueve la destrucción del cartílago y hueso a través de la inactivación del inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP-1), la oxidación de lípidos, la inhibición de la síntesis de colágeno y proteoglicanos (ambos componentes esenciales del cartílago), y la apoptosis de los condrocitos [98]. Dado que la vasoinhibina induce la expresión de iNOS en cultivos de STF y la consecuente biosíntesis de NO [29], investigamos si Vi45-51 y CRiVi45-51 afectan la síntesis de la iNOS y su actividad (biosíntesis de NO) en los STF. Observamos contundentemente que Vi45-51 y CRiVi45-51 no modifican la biosíntesis de NO vía iNOS



en las diferentes concentraciones utilizadas y, por ende, que no conservan la propiedad proinflamatoria de la vasoinhibina sobre los STF (**Figura 5-7**).

Con el objetivo de descartar el posible efecto proinflamatorio de Vi45-51 y CRiVi45-51 sobre la inflamación articular, se indujo el modelo de AIA leve inducida por la administración intraarticular de 2.5 μ g de ASBm. Bajo estas condiciones, se observó un aumento modesto pero significativo en la circunferencia de la articulación en ratones con AIA leve, junto con un incremento del área del pannus de ~3% en comparación con el área de la membrana sinovial sin artritis. Por otra parte, en ratones artríticos tratados con CRiVi45-51 se observó un ligero aumento en la inflamación inicial (día 1) pero no la modificó posteriormente (**Figura 8A**). CRiVi45-51 tampoco modificó el área del pannus de la articulación artrítica (**Figura 8 B y C**). Estos resultados contrastan con el reporte previo de Ortiz y colaboradores (2022) donde la vasoinhibina aumentó significativamente ~3% el área de la membrana sinovial en aquellos ratones artríticos tratados con vasoinhibina en comparación a aquellos artríticos control [29]. El análisis histológico revela una tendencia no significativa del CRiVi45-51 a disminuir el área del pannus (**Figura 8C**). Experimentos en curso se encuentran evaluando la expresión de factores proangiogénicos y proinflamatorios en la articulación del modelo de AIA leve para ahondar sobre las acciones de CRiVi45-51.

Hasta el momento, con base a los resultados obtenidos podemos comentar que Vi45-51 y CRiVi45-51 no exhiben efectos proinflamatorios de la vasoinhibina en cultivos de STF, y la ausencia de efecto proinflamatorio en la articulación en el modelo de AIA leve con CRiVi45-51. Consecutivamente y para poner en manifiesto el efecto benéfico de CRiVi45-51 sobre la articulación artrítica, se indujo el modelo de AIA grave a través de la administración intraarticular de una mayor cantidad de ASBm (20 μ g). La condición de AIA grave produjo un alto nivel de inflamación demostrado por el aumento significativo de la inflamación articular y la formación extensa del pannus, cuya área fue ~25% mayor que el área de la membrana sinovial de una articulación sana (**Figura 9 B y C**). Encontramos que CRiVi45-51 disminuyó significativamente tanto la inflamación articular como el área del pannus bajo condiciones de AIA grave (**Figura 9**). Esta acción sobre la inflamación articular muy probablemente se debe a los efectos inhibitorios de CRiVi45-51 sobre la angiogénesis del pannus dado que, al igual que lo reportado para la vasoinhibina [11], CRiVi45-51 disminuyó significativamente la expresión de genes que codifican para VEGF, el receptor 2 de VEGF, y HIF-1 α , todos factores protagónicos (**Figura 10**).



Notablemente, observamos el efecto de CRiVi45-51 para reducir la inflamación articular en la artritis y esto podría deberse por sus acciones inhibitorias sobre los vasos sanguíneos. Es conocido que la hipoxia desencadenada por la alta demanda de oxígeno asociada a la proliferación exacerbada de células de la membrana sinovial y a la infiltración de células inmunes promueve la actividad de HIF-1 α , factor de transcripción que induce la expresión del VEGF, y que el VEGF a través de su receptor 2 (VEGFR2) conduce las etapas tempranas de la angiogénesis, migración y proliferación de células endoteliales. El VEGF en conjunto con las angiopoyetina 1 (también proangiogénica) estimulan la maduración y estabilización de los neovasos [99]. Consistentemente, la expresión de los genes que codifican para estos factores proangiogénicos se eleva en el modelo de AIA grave y CRiVi45-51 los reduce en forma significativa (**Figura 10**). Estos resultados podrían apoyar la inhibición de la angiogénesis del pannus como mecanismo responsable de los efectos protectores de CRiVi45-51 en este modelo de artritis.

Las acciones vasculares de la vasoinhibina, Vi45-51 y CRiVi45-51 parecen involucrar la unión a un complejo multimérico en la membrana de las células endoteliales formado por el inhibidor del activador del plasminógeno - 1, la uroquinasa y el recetor de la uroquinasa [100] que resulta en el bloqueo de diferentes vías de señalización (Ras - Raf - MAPK, Ras - Tiam1 - Rac - 1 - Pak1 y PI3k / Akt y PLC γ - IP3 - sintasa endotelial de NO) activadas por varios factores proangiogénicos (VEGF, IL1 β , bradicinina) [15, 29]. Recientemente se demostró que la vasoinhibina inhibe la activación de la eNOS en las articulaciones artríticas inducida por VEGF [29] y Vi45-51 también inhibe la fosforilación de eNOS inducida por VEGF en cultivos de células endoteliales [15]. Por lo tanto, la inhibición de eNOS por CRiVi45-51 podría ser el mecanismo de sus efectos vasculares en las articulaciones artríticas. Cabe destacar, que aún es necesario desarrollar los estudios que nos permitan evidenciar el efecto de CRiVi45-51 sobre la densidad vascular y su mecanismo molecular de acción.

Estos hallazgos indican que el dominio antiangiogénico de la vasoinhibina es independiente de su dominio proinflamatorio. Resultados preliminares (no publicados) del laboratorio, han demostrado que cultivos enriquecidos en STF tratados con una vasoinhibina de 5.6 kDa (aminoácidos del 1 al 48 de la PRL), induce la biosíntesis de NO. La fragmentación en péptidos de 15 aminoácidos de la vasoinhibina de 5.6 kDa mostró que péptidos conformados por los aminoácidos 20 al 35 y 30 al 45 de la vasoinhibina, estimulan la biosíntesis de NO en cultivos enriquecidos de STF. Estas observaciones sugieren que el



dominio proinflamatorio de la vasoinhibina se localiza en los aminoácidos 30 al 35 de la molécula.

El efecto de Vi45-51 y CRiVi45-51 para el tratamiento de la artritis es de relevancia ante la vasoinhibina ya que, a diferencia de esta última, Vi45-51 y CRiVi45-51 poseen la acción antiinflamatoria indirecta (vía la inhibición de la angiogénesis) [15] pero no los efectos proinflamatorios directos sobre células no vasculares (STF). Además, CRiVi45-51 es estable, de fácil síntesis y puede ser administrado por vía oral. Dada la ausencia de un efecto proinflamatorio, Vi45-51 y CRiVi45-51 podrían tener mayor eficacia para evitar la progresión de la AR.

Los medicamentos que actualmente se prescriben para el tratamiento de la AR tienen como objetivo reducir o frenar el daño tisular a través de acciones antiinflamatorias, por ejemplo, inhibir la síntesis de mediadores proinflamatorios por los AINE's y los GC; antagonizar la acción o vías de señalización de citocinas proinflamatorias como la IL-6 o el TNF- α ; o bien, impedir la proliferación exacerbada de células en la membrana sinovial, mecanismos de acción de los FARME. Sin embargo, el éxito de estos tratamientos ha sido deplorable ante la existencia de SRAM que incluyen la dependencia farmacológica, el desarrollo de una artritis reactiva, entre otros [56-60]. Por ello, la implementación de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la AR es de gran importancia. Vi45-51 y CRiVi45-51 podrían representar potentes moléculas para el tratamiento de la artritis por sus acciones inhibitorias sobre los vasos sanguíneos. Además, Vi45-51 y CRiVi45-51 son moléculas pequeñas de fácil síntesis y estables en comparación con los FARME biológicos (anticuerpos humanizados).

El desarrollo de Vi45-51 y CRiVi45-51 como moléculas nuevas con acción antiangiogénica para el tratamiento de la AR se encuentra en una etapa inicial. Con base a las directrices establecidas por la International Council Harmonisation (ICH), se propone la realización de pruebas preclínicas orientadas a evaluar posibles riesgos de carcinogenicidad, genotoxicidad, reprotoxicidad, farmacocinética, y otros aspectos relacionados (<https://www.ich.org/page/safety-guidelines>). Esto subraya la imperante necesidad de llevar a cabo una serie de pruebas in vitro e in vivo en modelos biológicos (roedores y no roedores) como paso previo al desarrollo de los estudios clínicos.

En resumen, en este trabajo se puso en manifiesto la ausencia del efecto proinflamatorio de Vi45-51 y CRiVi45-51 sobre cultivos de STF. Además de la ausencia del efecto



proinflamatorio en el modelo de AIA leve bajo un tratamiento con CRiVi45-51 y el efecto benéfico en el modelo de AIA grave. El efecto de CRiVi45-51 en la AIA grave podrían estar involucradas sus acciones sobre los vasos sanguíneos en tanto que disminuyó la expresión de mediadores proangiogénicos. Queda por confirmar las acciones antiangiogénicas de CRiVi45-51 sobre la densidad vascular del pannus y su efecto sobre la expresión de mediadores proinflamatorios en la articulación artrítica. A largo plazo se deberá localizar la región proinflamatoria de la vasoinhibina y conducir estudios preclínicos que evalúen la seguridad, eficacia y calidad de Vi45-51 y CRiVi45-51 de la vasoinhibina en diferentes especies animales y su posterior desarrollo clínico.



10. Conclusiones

1. Vi45-51 y CRiVi45-51 no conservan las acciones proinflamatorias de la vasoinhibina sobre los STF tanto que no indujo la biosíntesis de NO vía iNOS.
2. CRiVi45-51 no modifica la inflamación articular en el modelo de AIA leve.
3. CRiVi45-51 disminuye la inflamación articular en el modelo de AIA grave.
4. CRiVi45-51 disminuye la expresión de *Vegf*, *Vegf-r2* y *Hif-1 α* en el modelo de AIA grave.
5. CRiVi45-51 no conserva los efectos duales de la vasoinhibina en el modelo de AIA.



11.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. pp. 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): pp. 12-22.
4. Casey, G., Arthritis: joints inflamed. *Kai Tiaki: Nursing New Zealand*, 2015. 21(5): p. 20.
5. 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): pp. 2929-2948.
6. George, G., G. Shyni, and K. Raghu, Current and novel therapeutic targets in the treatment of rheumatoid arthritis. *Inflammopharmacology*, 2020: pp. 1-20.
7. Paleolog, E.M. and J.M. Miotla, Angiogenesis in arthritis: role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. *Angiogenesis*, 1998. 2(4): pp. 295-307.
8. Dvorak, H.F., et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 1995. 146(5): pp. 1029-39.
9. Leblond, A., Y. Allanore, and J. Avouac, Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 2017. 16(6): pp. 594-601.
10. Clapp, C., et al., Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2006. 17(8): pp. 301-307.
11. 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. 100(8): pp. 1068-1079.
12. Firestein, G.S., Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis & Rheumatology*, 1996. 39(11): pp. 1781-90.



13. 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: pp. 1-12.
14. 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): pp. 1422-1429.
15. Robles, J.P. and M. Zamora, The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis*, 2022, vol. 25, no 1, p. 57-70.
16. Bartok, B. and G.S. Firestein, Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*, 2010. 233(1): pp. 233-255.
17. Adán, N., et al., Arthritis and prolactin: a phylogenetic viewpoint. *General and Comparative Endocrinology*, 2014. 203: pp. 132-136.
18. Gravallesse, E.M. and G.S. Firestein, Rheumatoid arthritis — common origins, divergent mechanisms. 2023. 388(6): pp. 529-542.
19. Murphy, G. and H. Nagase, Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Reviews Rheumatology*, 2008. 4(3): pp. 128-135.
20. 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): pp. 256-266.
21. Jiang, X., et al., Comprehensive TCR repertoire analysis of CD4+ T-cell subsets in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 2020: pp. 102432.
22. 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): pp. 446-451.
23. Boissier, M.-C., et al., Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of Autoimmunity*, 2012. 39(3): pp. 222-228.



24. Bustamante, M.F., et al., Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2017. 19(1): p. 110.
25. Müller-Ladner, U., et al., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*, 2007. 9(6): p. 223.
26. Clapp, C., et al., Dual Roles of Prolactin and Vasoinhibin in Inflammatory Arthritis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022. 13: p. 905756.
27. McInnes, I.B. and G. Schett, Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 2007. 7(6): pp. 429-442.
28. Ritchlin, C., Fibroblast biology Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2000. 2(5): pp. 1-5.
29. Ortiz, G., et al., Vasoinhibin is generated and promotes inflammation in mild antigen-induced arthritis. *Endocrinology*, 2022. 163(5).
30. Blanco, F.J., et al., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American Journal of Pathology*, 1995. 146(1): pp. 75.
31. Spiller, F., et al., Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*, 2019. 89: pp. 32-40.
32. de Oliveira, C.M.B., et al., Citocinas y dolor. 2011. 61(2): pp. 137-142.
33. J. Bruce Smith, M.K.H., *Rheumatoid Arthritis—A Molecular Understanding*. 2002. 136(12): pp. 908-922.
34. Rengel, Y., C. Ospelt, and S. Gay, Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Research & Therapy*, 2007. 9(5): p. 221.
35. Teitelbaum, S.L., Bone Resorption by Osteoclasts. 2000. 289(5484): pp. 1504-1508.
36. Haringman, J.J. and P.P. Tak, Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Research & Therapy*, 2004. 6(3): p. 93.
37. Dimberg, A., Chemokines in angiogenesis, in the chemokine system in experimental and clinical hematology, O. Bruserud, Editor. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. pp. 59-80.



38. Stuehr, D.J., et al., Update on mechanism and catalytic regulation in the no synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(35): pp. 36167-36170.
39. McCartney-Francis, N.L., et al., Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *The Journal of Immunology*, 2001. 166(4): pp. 2734-2740.
40. Ueki, Y., et al., Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 1996. 23(2): pp. 230-236.
41. Blanco García, F.J., F.J. de Toro, and F. Galdo Fernández, El óxido nítrico y el cartílago articular. *Revista Española de Reumatología*, 2000. 27(3): pp. 99-106.
42. Elshabrawy, H.A., et al., The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*, 2015. 18(4): pp. 433-448.
43. Di Giovine, F.S., G. Nuki, and G.W. Duff, Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1988. 47(9): pp. 768-72.
44. Elemam, N.M., S. Hannawi, and A.A. Maghazachi, Role of chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *ImmunoTargets and Therapy*, 2020. 9: pp. 43-56.
45. Wu, Q., et al., Serum IFN- λ 1 is abnormally elevated in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity*, 2013. 46(1): pp. 40-43.
46. Remmers, E.F., H. Sano, and R.L. Wilder, Platelet-derived growth factors and heparin-binding (fibroblast) growth factors in the synovial tissue pathology of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 1991. 21(3): pp. 191-199.
47. Marc Feldmann, a. Fionula M. Brennan, and Ravinder N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis. 1996. 14(1): pp. 397-440.
48. Voron, T., et al., Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Frontiers in oncology*, 2014. 4: p. 70.
49. FitzGerald, O., et al., Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1991. 50(11): pp. 792-796.



50. Bodamyali, T., et al., Influence of hypoxia in inflammatory synovitis. *Annals of the rheumatic diseases*, 1998. 57(12): pp. 703-710.
51. Paleolog, E.M., Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2002. 4(3): pp. 1-10.
52. 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): pp. 1-16.
53. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *ImmunoTargets and Therapy*, 2006. 11(1): pp. 529-543.
54. 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.
55. Ulfgren, A.-K., et al., Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2000. 59(6): pp. 439-447.
56. Smolen, J.S., et al., EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2023. 82(1): pp. 3-18.
57. Gaffo, A., K.G. Saag, and J.R. Curtis, Treatment of rheumatoid arthritis. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2006. 63(24): pp. 2451-2465.
58. Davis III, J.M., et al., Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Arthritis & Rheumatology*, 2007. 56(3): pp. 820-830.
59. Tanaka, Y., Recent progress in treatments of rheumatoid arthritis: an overview of developments in biologics and small molecules and remaining unmet needs. *Rheumatology*, 2021. 60(Supplement_6): pp. vi12-vi20.
60. Shi, W., et al., Safety and efficacy of oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Drug Investigation*, 2004. 24(2): pp. 89-101.
61. Wang, Y., et al., Avastin exhibits therapeutic effects on collagen-induced arthritis in rat model. *Inflammation*, 2013. 36(6): pp. 1460-1467.



62. Lethaby, A., et al., Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013(5) CD004525.
63. Saag, K.G. and J.R. Kirwan, Glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis, in modern therapeutics in rheumatic diseases. G.C. Tsokos, Editor. 2002, Humana Press: Totowa, NJ. pp. 65-88.
64. Hardy, R.S., K. Raza, and M.S. Cooper, Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020. 16(3): pp. 133-144.
65. Cronstein, B.N. and T.M. Aune, Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020. 16(3): pp. 145-154.
66. Suissa, S., et al., Newer disease-modifying antirheumatic drugs and the risk of serious hepatic adverse events in patients with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*, 2004. 117(2): pp. 87-92.
67. Cohen, S.B., et al., Long-term safety of tofacitinib up to 9.5 years: a comprehensive integrated analysis of the rheumatoid arthritis clinical development programme. *RMD Open*, 2020. 6(3): p. e001395.
68. Nash, P., et al., Points to consider for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases with Janus kinase inhibitors: a consensus statement. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2021. 80(1): pp. 71-87.
69. Clapp, C., et al., Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015. 846: pp. 83-95.
70. 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): pp. 191-216.
71. Gerlo, S., et al., Prolactin in man: a tale of two promoters. *Bioessays*, 2006. 28(10): pp. 1051-1055.
72. Li, C.H., et al., Amino-acid sequence of ovine lactogenic hormone. *Nature*, 1969. 224(5220): pp. 695-696.
73. 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): pp. 935-938.



74. Ge, G., et al., Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [aunque es largo, es el primero mencionado por la National Library of Medicine (NLM)], 2007. 104(24): pp. 10010-10015.
75. Macotela, Y., et al., Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science*, 2006. 119(9): pp. 1790-1800.
76. Friedrich, C., et al., Plasmin generates vaso-inhibin-like peptides by cleaving prolactin and placental lactogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021. 538: p. 111471.
77. Zamora, M., et al., Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6-kDa vaso-inhibin: implication for tissue repair. *Endocrinology*, 2021. 162(12): p. bqab177.
78. Adán-Castro, E., et al., Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vaso-inhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 2022. 34(4): p. e13091.
79. Corbacho, A.M., et al., Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(18): pp. 13183-13186.
80. Macotela, Y., et al., Rapid communication: 16K Prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *Journal of endocrinology*, 2002. 175(3): pp. R13-R18.
81. López-Bojorquez, L.N., La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de investigación clínica*, 2004. 56(1): pp. 83-92.
82. Shachar, I. and N. Karin, The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013. 93(1): pp. 51-61.
83. Zakharova, M. and H.K. Ziegler, Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-α: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 2005. 175(8): pp. 5024-5033.
84. Moreno-Carranza, B., et al., Sequence optimization and glycosylation of vaso-inhibin: Pitfalls of recombinant production. *Protein expression and purification*, 2019. 161: pp. 49-56.



85. Di Cera, E., Thrombin. *molecular aspects of medicine*, 2008. 29(4): pp. 203-254.
86. 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. 1999, Diario Oficial de la Federación México.
87. Zhao, J., et al., A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts. *Biomedical reports*, 2016. 5(2): pp. 171-175.
88. Brackertz, D., G.F. Mitchell, and I.R. Mackay, Antigen-induced arthritis in mice. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis and rheumatism*, 1977. 20(3): pp. 841-850.
89. Ghasemi, S., et al., Identification of reliable reference genes for quantitative real-time pcr in equine fibroblast-like synoviocytes treated by doxycycline. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2017. 50: pp. 44-51.
90. Bauer, S., et al., Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 2006. 8(6): p. R171.
91. Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*, 1992. 6(12): pp. 3051-3064.
92. Peacock, D.J., M.L. Banquerigo, and E. Brahn, Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 1992. 175(4): pp. 1135-1138.
93. Radomska-Leśniewska, D.M., A. Białoszewska, and P. Kamiński, Angiogenic properties of NK cells in cancer and other angiogenesis-dependent diseases. *Cells*, 2021. 10(7): p. 1621.
94. Storgard, C.M., et al., Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha v \beta 3$ antagonist. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999. 103(1): pp. 47-54.
95. Takahashi, H., et al., Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clinical and experimental rheumatology*, 2005. 23(4): p. 455.
96. Semerano, L., et al., Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine*, 2011. 78(2): pp. 118-123.



97. Jang, D. and G.A.C. Murrell, Nitric oxide in arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998. 24(9): pp. 1511-1519.
98. Lotz, M., The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 1999. 25(2): pp. 269-282.
99. Arsic, N., et al., Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Molecular Therapy*, 2003. 7(4): pp. 450-459.
100. Bajou, K., et al., PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nature medicine*, 2014. 20(7): pp. 741-747.