



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS DUALES DE LA PROLACTINA SOBRE LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA DE TEJIDOS DE LA ARTICULACIÓN**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA:

**M. en C. JOSE FERNANDO GARCÍA RODRIGO**

TUTOR

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN

**DRA. ROCIO BRENDA ANGUIANO SERRANO**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

**JURIQUILLA, QUERÉTARO, MÉXICO. MARZO DE 2024**



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. El trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM (proyecto IN202321) y por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI-061-2023). El alumno recibió beca del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) con número de registro 921797

## **Jurado de Examen**

*Integrantes:*

**Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora**

**Dr. Jean-Louis Joseph Marie Charlie Casalonga**

**Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco**

**Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno**

**Dra. Martha Legorreta Herrera**

# Índice

Agradecimientos institucionales.....	VI
Agradecimientos personales.....	VIII
Resumen.....	XII
Abstract.....	XIII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Estructura articular.....	3
2.2 Artritis reumatoide.....	4
2.3 Fibroblastos sinoviales.....	5
2.4 Citocinas proinflamatorias.....	6
2.4.1 IL-1 $\beta$ .....	6
2.4.2 TNF- $\alpha$ .....	7
2.5 NF- $\kappa$ B.....	8
2.5.1 NF- $\kappa$ B y artritis reumatoide.....	10
2.5.2 NF- $\kappa$ B y fibroblastos sinoviales.....	12
2.6 Prolactina.....	13
2.6.1 Mecanismo de secreción y regulación.....	13
2.6.2 Vía de señalización.....	14
2.6.3 Dualidad de efectos de la prolactina en la artritis reumatoide.....	16
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	19
5.1 General.....	19
5.2 Particulares.....	19
6. Metodología.....	20
6.1 Diseño experimental.....	20
6.2 Materiales.....	20

6.3 Animales.....	20
6.4 Extracción de fibroblastos sinoviales .....	21
6.5 Ensayo de actividad metabólica (MTT).....	21
6.6 Ensayo de proliferación (click).....	22
6.7 Ensayo de apoptosis (ELISA).....	22
6.8 Expresión del ARNm de marcadores moleculares de inflamación .....	23
6.8.1 Extracción de ARN .....	23
6.8.2 Síntesis de ADNc .....	24
6.8.3 qRT-PCR .....	24
6.9 ELISA de IL-6.....	25
6.10 Western blot.....	25
6.11 Ensayo de translocación nuclear de NF-kB.....	26
6.12 Histología y evaluación de infiltrados inmunes .....	26
6.13 Análisis estadístico .....	26
7. Resultados.....	28
7.1 La PRL inhibe o estimula la actividad metabólica inducida por la IL-1 $\beta$ o el TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente .....	28
7.2 Los efectos duales de la PRL no se asocian con cambios en la supervivencia o proliferación de fibroblastos sinoviales de ratones macho. ....	30
7.3 La PRL inhibe o estimula la expresión de mediadores proinflamatorios en fibroblastos sinoviales de ratones macho en respuesta a IL-1 $\beta$ o TNF- $\alpha$ , respectivamente.....	32
7.4 La IL-1 $\beta$ aumenta y el TNF- $\alpha$ disminuye la expresión del receptor largo de PRL en fibroblastos sinoviales de ratones macho. ....	34
7.5 La PRL no modifica la expresión de los receptores de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho. ....	35
7.6 BAY-11-7885 (BAY) inhibe la translocación nuclear de NF-kB inducida por IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho. ....	37

7.7 La PRL inhibe o estimula la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$ o TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente. ....	39
7.8 La PRL inhibe o aumenta la degradación de I $\kappa$ -B $\beta$ e I $\kappa$ -B $\alpha$ inducida por IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.....	41
7.9 La PRL previene la expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$ en articulaciones de ratones macho.....	43
7.10 La PRL previene la hiperplasia sinovial inducida por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$ en articulaciones de ratones macho.....	45
7.11 La IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$ no generan daños en estructuras articulares en un modelo agudo de inflamación in vivo. ....	47
7.12 La PRL previene la infiltración de células inmunitarias en respuesta a IL-1 $\beta$ , pero no frente a TNF- $\alpha$ . ....	48
7.13 La acción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ también ocurre en ratones hembra sobre fibroblastos sinoviales in vitro. ....	49
7.14 La acción diferencial de PRL sobre los efectos articulares de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ también ocurre en ratones hembra in vivo.....	50
8. Discusión .....	51
9. Resumen gráfico .....	58
10. Bibliografía.....	59
11. Índice de figuras .....	73
12. Índice de tablas .....	75
13. Anexos.....	76
13.1 Publicaciones.....	76
13.2 Congresos.....	78
13.3 Artículo de investigación derivado de esta tesis.....	79

## **Agradecimientos institucionales**

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por otorgar las facilidades y equipamiento necesarios para la realización de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora responsable de la dirección de este proyecto y de las ideas aquí vertidas.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Janette Furuzawa Carballeda y a la Dra. Brenda Anguiano Serrano, miembros de mi comité tutorial, quienes aportaron valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera, técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su apoyo técnico.

Al Mtro. Fernando López Barrera, técnico académico del Laboratorio de Endocrinología Molecular, por su apoyo técnico.

A los laboratoristas Antonio Prado y Daniel Mondragón, por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo.

A la unidad de bioterio, en especial a la Dra. Alejandra Castilla León, al M.V.Z. José Martín García Servín, a la Dra. María Antonieta Carbajo Mata y a la Biol. María Eugenia Ramos Aguilar, por su apoyo técnico, manejo y cuidado de los animales de experimentación.



A la unidad de enseñanza y posgrado y en especial, a la Dra. Nuri Aranda López y a María del Carmen Mendoza López por su invaluable asistencia administrativa.

Al apoyo brindado por el Mtro. Javier Valles Valenzuela responsable de la biblioteca del campus UNAM-Juriquilla; así como al Ing. Ramón Martínez Olvera y a M. Moises Mendoza Baltazar responsables de las unidades de cómputo y de video conferencias del Instituto de Neurobiología, respectivamente.

Al apoyo técnico de la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología.

Al respaldo técnico de la M. en C. Adriana González Gallardo, responsable de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología.

## Agradecimientos personales

A mis papás **Ramón** y **Rosy**, siempre han sido mi ejemplo y mi guía, me han enseñado el valor de la perseverancia y el amor a lo que hago. Sin ustedes no hubiera tenido el impulso ni la dirección que tengo hoy.

A mi hermana **María Isabel**, la mujer que me enseña día con día que las dificultades que la vida nos pone no son más que aprendizajes en forma de obstáculos. Sin ti no hubiera podido enfrentarme a los retos tanto académicos como personales de estos 4 años. Eres mi ejemplo a seguir y agradezco a la vida de tenerte como mi hermana y amiga.

A los miembros del laboratorio A14 y A15. A la **Dra. Carmen Clapp** por confiar en mi desde el primer momento y enseñarme con su ejemplo que el éxito va después del esfuerzo y esmero en el trabajo. A los miembros del equipo de artritis, **Lupita**, **Georgina** y **Oscar Fernando**. Gracias por acompañarme desde el inicio del proyecto. Aprendí que mi fuerza es el resultado del apoyo y empeño de cada uno de ustedes. A los miembros del equipo ojo, **Elva**, **Montse**, **Dani** y **Freinet**, por abrirme las puertas e involucrarme como uno más de ustedes. Agradezco todo el aprendizaje y las risas que generaba el estrés de hacer Evan Blue. A **Xaru**, por siempre tener un momento para hablar y apoyarme en los experimentos que requerían de mucha ayuda. Ya no podré interrumpirte mientras trabajas, pero espero tu sigas haciéndolo con los demás siempre. A **Don Toño** por apoyarme de manera incondicional en la preparación de reactivos y geles. Sin su apoyo no hubiera logrado terminar mis experimentos. A **Dina**, no solo por ser mi roomie, sino también por involucrarme en su proyecto y mostrarme que siempre hay que verle el lado bueno a las situaciones complicadas. A **Freinet**, por ser mi compañero de maestría y doctorado. Gracias a ti me sentí acompañado durante los difíciles procesos de titulación y admisión. A **Miri**, porque no solo te volviste mi amiga, sino mi cómplice al momento de obtener “información”. Gracias por siempre darme una sonrisa y apoyarme en todo.

A mis amigos del instituto de neurobiología. Gracias **Jalil, Martín y Fernando**, porque empezamos siendo unos desconocidos y ahora tengo el privilegio de llamarlos familia.

A **Fernando**. La primera persona que me abrió la puerta del laboratorio, mi “nuevo” mejor amigo, mi compañero de entrenamiento y ahora mi hermano. Gracias por volverte una persona indispensable en mi vida, por siempre tener nuestras charlas de café, por los consejos, por el tiempo y sobre todo por ser mi apoyo durante mis tropiezos. Estaré por siempre agradecido amigo.

A **Georgina**. Mi compañera, amiga y esposa. Gracias por recibirme con una sonrisa. Fuiste mi maestra y cómplice durante estos 6 años. Me ensañaste mucho y me mostraste que un error con una sonrisa es solo un aprendizaje inesperado. Todo lo que está plasmado en esta tesis es gracias a ti.

A mi familia y amigos:

**Gracias por ser mi mayor fortaleza**

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”*

**Marie Curie**

## Resumen

La estrecha asociación entre la artritis reumatoide (AR), el sexo, el estado reproductivo y el estrés ha vinculado durante mucho tiempo a la hormona prolactina (PRL) con la progresión de la enfermedad. La PRL posee efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios en la AR, pero los mecanismos de estos efectos aún no se comprenden. En este trabajo, mostramos que la PRL modula de manera opuesta las acciones proinflamatorias de la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en cultivos murinos de fibroblastos sinoviales (FS). Tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  aumentaron la actividad metabólica y la expresión de mediadores proinflamatorios (*Il1b*, *Inos* e *Il6*) mediante la activación transcripcional del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB). Sin embargo, la IL-1 $\beta$  aumentó y el TNF- $\alpha$  disminuyó los niveles de la isoforma larga del receptor de la PRL ( $\text{LRPRL}$ ) en asociación con las acciones duales de esta hormona sobre la respuesta inflamatoria de los fibroblastos sinoviales. La PRL redujo el efecto proinflamatorio y la activación de NF-kB en respuesta a la IL-1 $\beta$ , pero aumentó la inflamación y la señalización de NF-kB inducidas por el TNF- $\alpha$ . El papel dual de la PRL frente a las dos citocinas también se manifestó *in vivo*. Se inyectaron IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  con o sin PRL en las articulaciones de la rodilla de ratones sanos y se evaluó la inflamación articular 24 horas después. La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  aumentaron la expresión de factores proinflamatorios y la infiltración de células inmunitarias. La PRL previno las acciones de la IL-1 $\beta$ , pero fue inactiva o elevó aún más el efecto proinflamatorio del TNF- $\alpha$ . Concluimos que la PRL ejerce acciones opuestas sobre la inflamación articular, tanto de ratones macho como hembra, que dependen de su interacción con citocinas proinflamatorias específicas, la expresión del  $\text{LRPRL}$  y la activación de la vía NF-kB. Proponemos que estas acciones opuestas de la PRL pueden contribuir a modular la inflamación articular en la AR y a generar información relevante para el desarrollo de nuevos tratamientos.

## Abstract

The close association between rheumatoid arthritis (RA), sex, reproductive state, and stress has long linked the hormone prolactin (PRL) to disease progression. PRL has both proinflammatory and anti-inflammatory outcomes in RA, but responsible mechanisms are not understood. Here, we show that PRL modifies in an opposite manner the proinflammatory actions of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in mouse synovial fibroblasts (SF) in culture. Both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upregulated the metabolic activity and the expression of proinflammatory factors (*Il1b*, *Inos*, and *Il6*) via the activation of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. However, IL-1 $\beta$  increased and TNF- $\alpha$  decreased the levels of the long PRL receptor isoform ( $\text{LRPRL}$ ) in association with dual actions of PRL on SF inflammatory response. PRL reduced the proinflammatory effect and activation of NF- $\kappa$ B by IL-1 $\beta$  but increased TNF- $\alpha$ -induced inflammation and NF- $\kappa$ B signaling. The double-faceted role of PRL against the two cytokines manifested also *in vivo*. IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  with or without PRL were injected into the knee joints of healthy mice and joint inflammation was monitored after 24 hours. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increased the joint expression of proinflammatory factors and the infiltration of immune cells. PRL prevented the actions of IL-1 $\beta$  but was either inactive or further increased the proinflammatory effect of TNF- $\alpha$ . We conclude that PRL exerts opposite actions on joint inflammation in males and females that depend on specific proinflammatory cytokines, the level of the  $\text{LRPRL}$ , and the activation of NF- $\kappa$ B signaling. Dual actions of PRL may help balance joint inflammation in RA and provide insights for development of new treatments.

## **1. 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 [1% de la población mundial (2) y 1.6% en México (3)] la artritis reumatoide (AR), una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune caracterizada por la inflamación de las articulaciones, donde la infiltración de células inmunes en la membrana sinovial y la hiperplasia de células residentes conllevan al desarrollo de un frente inflamatorio (“pannus”) que destruye el cartílago y el hueso (4-6) mediante la acción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , el interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y la interleucina 6 (IL-6) (7). Estas citocinas estimulan la muerte celular y la degradación de la matriz extracelular del cartílago (8) y del hueso (9) y su bloqueo previene el deterioro articular (10). Es por ello que los factores capaces de modificar la acción de las citocinas proinflamatorias tienen importancia en la prevención y tratamiento de la AR. Uno de estos factores es la hormona prolactina (PRL).

Por muchos años se ha ligado a la PRL con la fisiopatología de la AR principalmente porque este padecimiento tiene mayor prevalencia en mujeres y se altera en estadios reproductivos (11). La PRL es sexualmente dimórfica (sus niveles circulantes son mayores en las mujeres), aumenta durante el embarazo y la lactancia y se eleva en algunos pacientes con AR. Sin embargo, la influencia de la PRL sobre la AR es aún controversial debido a que no hay una correlación clara entre sus niveles circulantes y la severidad del padecimiento. Por ejemplo, el embarazo promueve la remisión de la AR (11-13) pero la lactancia aumenta su actividad (11, 14-16).

Además, la PRL tiene acciones sobre células inmunes y tejidos de la articulación que pueden afectar la progresión de la AR tanto de manera positiva como negativa (17). Se ha propuesto que las acciones opuestas de la PRL dependen de su concentración en circulación (17), de la síntesis de PRL por tejidos de la articulación,



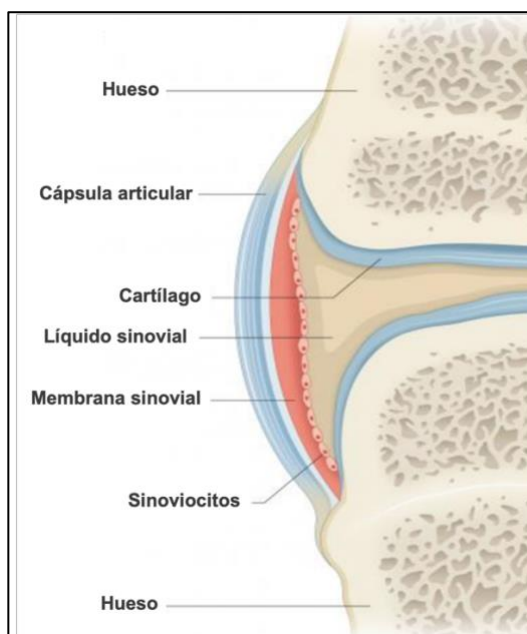
del nivel de expresión del receptor de PRL (RPRL) y de interacciones complejas en el ambiente inflamatorio. Por ejemplo, el ambiente inflamatorio contiene metaloproteasas de matriz (MMP) que procesan proteolíticamente a la PRL a vasoinhibina, un fragmento de la PRL que inhibe la angiogénesis y tiene efectos proinflamatorios (11, 18).

Estudios de nuestro laboratorio muestran que la PRL protege contra la inflamación y destrucción de la articulación en el modelo de artritis inflamatoria inducida por adyuvante (8) y que los fibroblastos sinoviales (FS) pueden ser blanco de estas acciones protectoras (9). Sin embargo, recientemente encontramos que la PRL también puede actuar sobre los FS promoviendo procesos inflamatorios. En este estudio analizamos el mecanismo de las acciones duales de la PRL sobre los FS y sobre un modelo de inflamación articular aguda a través de determinar la expresión de mediadores proinflamatorios, la expresión del RPRL, la activación de la vía de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), y la infiltración de células inmunes a la cavidad articular.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Estructura articular

Las articulaciones móviles están contenidas dentro de una capsula articular conformada por la membrana sinovial constituida por células (sinoviocitos) (7), responsables de secretar el líquido sinovial que nutre y lubrica al cartílago (19), un tejido avascular que recubre los extremos de los huesos evitando su desgaste y permitiendo su libre movimiento (Figura 1). Desde una perspectiva evolutiva, la formación y el posicionamiento corporal de las articulaciones permiten la adaptación exitosa de los vertebrados a una gran variedad de ambientes ecológicos. Algunas enfermedades infecciosas o insultos traumáticos pueden desencadenar procesos inflamatorios articulares con amplias repercusiones en la capacidad motora de los organismos (20).



**Figura 1.** Representación gráfica de los componentes de una articulación sinovial sana. (Modificado de J.S. Smolen et al, 2016)

La inflamación articular causa dolor, hinchazón y disfunción que conllevan a una discapacidad motriz (21). Estos procesos se promueven en la membrana sinovial y determinan padecimientos conocidos como artritis inflamatorias (22) que pueden ocasionar daños irreversibles al cartílago (8) y al hueso (9).

## **2.2 Artritis reumatoide**

Dentro de las artritis inflamatorias destaca por su prevalencia [1% de la población mundial (2) y 1.6% en México (3)] la AR, una enfermedad inflamatoria progresiva autoinmune que está asociada con efectos tanto sistémicos como articulares (5). Esta patología se caracteriza por afectar principalmente las articulaciones pequeñas de manos y pies, aunque sus efectos en articulaciones de mayor tamaño también son comunes (7). Además de las afecciones articulares, se han descrito diversas complicaciones sistémicas que afectan a los sistemas cardiovascular, pulmonar, dermatológico y neurológico, entre otros (23). Estos daños se deben al carácter sistémico de la inflamación en la AR (24, 25).

La etiología de la AR aún no es clara, pero se acepta que factores genéticos aumentan la susceptibilidad en el desarrollo de la AR. Dentro de los principales polimorfismos se encuentran los asociados a alteraciones en los genes que codifican la tirosina fosfatasa no receptora 22 (PTPN22), que regula negativamente la activación de las células T; el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 1-componente 5 del complemento (TRAF1-C5), implicado en la señalización de factores de necrosis tumoral (TNF) para modular procesos inflamatorios y apoptóticos; el transductor de señales y activador de la transcripción 4 (STAT 4), que codifica una proteína involucrada en la transducción de señales en las células del sistema inmunológico, especialmente en la respuesta a interleucinas e interferones del tipo I; y el gen que codifica la peptidil arginina deiminasa 4 (PADI 4), una enzima relacionada con la citrulinación de proteínas. (11, 26-28).

También se han propuesto influencias ambientales [como el tabaquismo (29-31), el tipo de dieta (30, 32), las enfermedades infecciosas (33, 34), y las alteraciones en la microbiota (28)] y factores propios del huésped [como el estrés, el sexo y el estadio reproductivo (11)]. Se considera que una combinación de estas influencias determinaría una respuesta inmune aberrante capaz de propiciar la infiltración de células inmunes a la cavidad articular, la proliferación de células sinoviales residentes (sinoviocitos) y la angiogénesis, lo que a su vez conduciría a un ambiente rico en mediadores proinflamatorios y enzimas proteolíticas (7, 30). La activación de

vías de señalización responsivas a citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 17 (IL-17), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 2 (IL-2) en las células sinoviales conlleva a la expansión del frente inflamatorio o pannus que es responsable de la degradación del hueso y el cartílago (35-37). Entre las células locales que destacan por su participación en los procesos inflamatorios de la articulación se encuentran los fibroblastos sinoviales (FS) (7).

### **2.3 Fibroblastos sinoviales**

La membrana sinovial es una estructura que recubre las articulaciones móviles, produce el líquido sinovial que nutre al cartílago y protege los extremos de los huesos, permitiendo así el libre movimiento. Los FS constituyen el componente celular más abundante de la membrana sinovial normal (38) y tienen como función la síntesis de componentes del líquido sinovial como son el ácido hialurónico y la lubricina (39).

Los FS participan en el inicio y progresión de la AR a través de su activación en respuesta a citocinas proinflamatorias que se traduce en la síntesis de citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO) y enzimas proteolíticas (metaloproteasas de matriz, entre otras), además que se propicia su proliferación y migración (7, 40). Estos cambios favorecen y potencian la formación del pannus como frente inflamatorio que destruye el cartílago y el hueso (40-43).

Un punto clave de la acción proinflamatoria de los FS es su interacción con células inmunes infiltradas en la articulación. Se ha reportado que los FS expuestos a citocinas como la interleucina 17 (IL-17) producida por células T (CD4+) inducen la síntesis de IL-6, la cual es una citocina determinante en el proceso de resorción del hueso (44). Además, los FS producen interleucinas como la interleucina 15 (IL-15), la interleucina 7 (IL-7) y la interleucina 8 (IL-8) que promueven la activación y expansión local de las células T infiltradas al sinovio y amplifican procesos inflamatorios locales a través de activar a neutrófilos y macrófagos (45). Los FS también pueden inducir la diferenciación de las células B (mononucleares de las

amígdalas) hacia células plasmáticas secretoras de IgM (46), contribuyendo así a la producción aumentada de inmunoglobulinas y factores reumatoides que activan al sistema del complemento y contribuyen a la perpetuación de la reacción inflamatoria local (47-49).

## **2.4 Citocinas proinflamatorias**

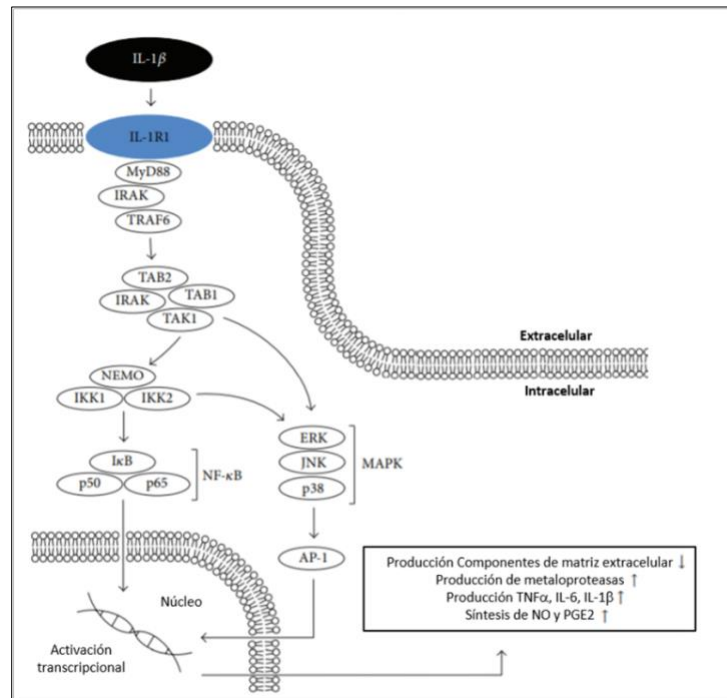
Dentro de la gran variedad de citocinas proinflamatorias que se producen por los FS durante la AR, destacan la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (50, 51), las cuales desencadenan la activación de diferentes tipos celulares, incluyendo los propios FS, lo que perpetúa su autoproducción y potencia el daño a la articulación. La importancia de este proceso en la patofisiología de la AR se constata con el hecho de su tratamiento incluye el uso de anticuerpos dirigidos contra la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (52, 53).

### **2.4.1 IL-1 $\beta$**

La IL-1 $\beta$  es una de las citocinas claves para el desarrollo de la AR, debido a su alta capacidad de inducir reacciones inflamatorias de manera independiente o combinada con algunas otras citocinas proinflamatorias (54). Esta proteína se forma como un precursor citosólico (pro-IL-1 $\beta$ ) y su escisión por acción de complejos enzimáticos intracelulares permite su liberación al espacio extracelular (55). La síntesis de esta proteína se lleva a cabo en las células articulares residentes como condrocitos, osteoblastos, FS y macrófagos sinoviales, además de células inmunes reclutadas a la cavidad articular como resultado del proceso inflamatorio (56, 57). En particular, los FS tienen una alta capacidad de sintetizar a la IL-1 $\beta$  que a su vez estimula en los FS su autoproducción y la del TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y de quimiocinas como el ligando de quimiocina de motivo C-C 5 (CCL5) (7, 58).

La IL-1 $\beta$  actúa a través de su receptor membranal IL-1R1 (59, 60) induciendo la activación de vías de señalización entre las que sobresalen la del NF- $\kappa$ B (61) y la quinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK) (62) relacionadas con la expresión de cientos de genes cuyos productos incluyen citocinas proinflamatorias,

quimiocinas, moléculas de adhesión, mediadores inflamatorios y enzimas (7, 63) (Figura 2).



**Figura 2.** Vía de señalización intracelular de la IL-1β. (Modificado de Wojdasiewicz et al, 2014)

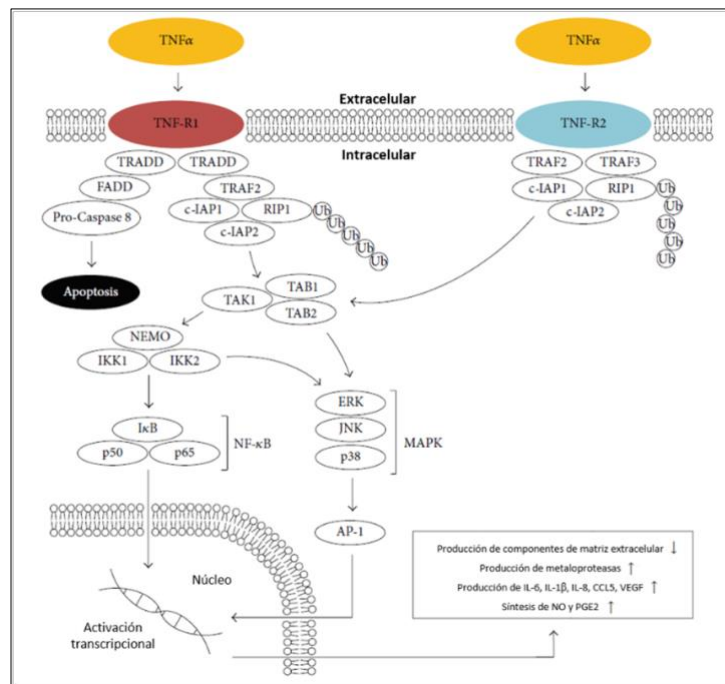
### 2.4.2 TNF-α

El TNF-α y la IL-1β son citocinas clave para los procesos inflamatorios en patologías articulares como la AR y la osteoartritis (OA) (51, 54). El TNF-α se secreta por las mismas células que sintetizan IL-1β, y su aumento se ha reportado en líquido sinovial, cartílago, hueso y en las células sinoviales bajo condiciones de inflamación (56, 64).

El TNF-α se forma como una proteína transmembranal homotrimérica la cual es secretada al espacio extracelular una vez que las metaloproteasas la escinden y la liberan. Esta citocina tiene la capacidad de unirse a dos isotipos de receptores membranales conocidos como TNF-R1 y TNF-R2 (65, 66) (Figura 3). Se ha reportado que en patologías como la OA, existe un aumento en la expresión de

estos receptores en los FS (67) lo que, al igual que para la IL-1 $\beta$ , perpetua la producción de mediadores de inflamación.

Las acciones directas del TNF- $\alpha$  sobre su receptor activan vías de señalización como la de la cinasa de JUN (JNK), la cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la del NF- $\kappa$ B, entre otras (66).



**Figura 3.** Vía de señalización intracelular del TNF- $\alpha$  (Modificado de Wojdasiewicz et al, 2014).

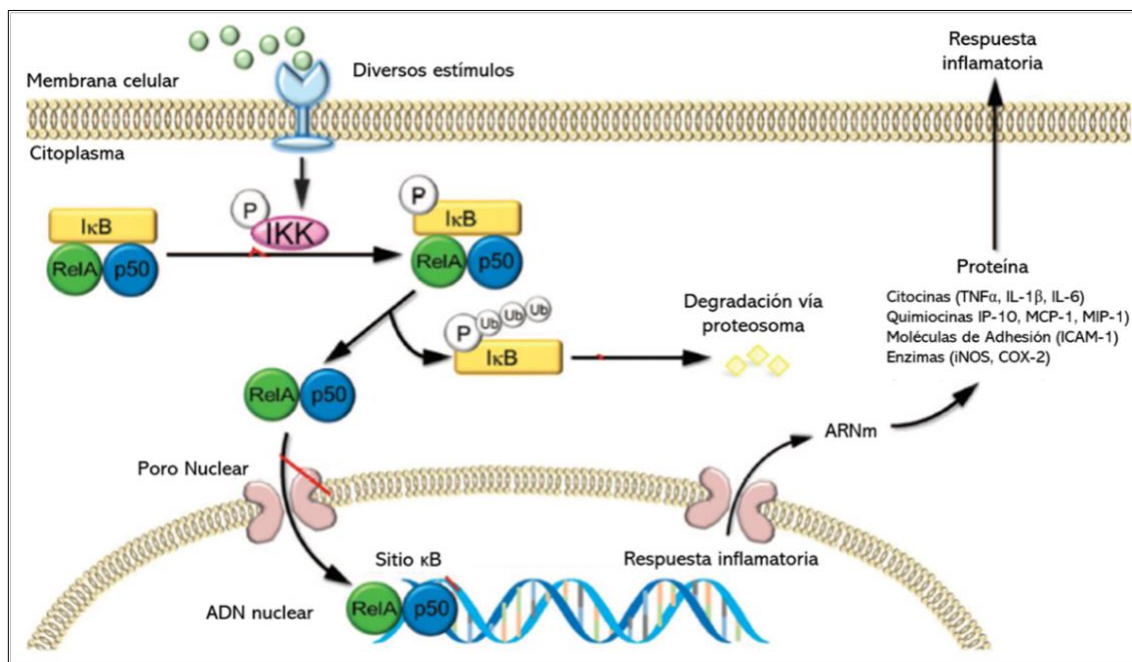
### 2.5 NF- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B representa una familia de factores de transcripción inducibles bajo estímulos que incluyen a citocinas proinflamatorias, radiación ultravioleta, estrés, agentes patógenos, etc (68). La vía de señalización activada por este factor de transcripción desempeña un papel central en la inflamación al regular la expresión de varios grupos de genes proinflamatorios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, prostaglandinas y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (7, 69).

Existen 5 miembros de la familia de NF- $\kappa$ B en mamíferos: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB, and c-Rel. Todos los miembros de esta familia comparten

un dominio Rel que les permite asociarse entre ellos y formar diferentes complejos homo o heterodiméricos (70).

En la vía de señalización clásica de NF- $\kappa$ B, las subunidades p65 y p50 se heterodimerizan y quedan secuestradas como un complejo inactivo en el citoplasma debido a su unión con proteínas inhibitorias conocidas como I $\kappa$ B (71), inhibiendo así su ingreso al núcleo. Tras la activación por estímulos proinflamatorios como la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , el complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), compuesto por tres componentes principales: IKK1 (IKK $\alpha$ ) e IKK2 (IKK $\beta$ ) y por la subunidad reguladora estequiométrica NEMO (IKK $\gamma$ ) (68), fosforilan a las I $\kappa$ B (72), dirigiéndolas a su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma (73). Esto permite que el complejo p65/50 se transloque al núcleo, donde p65 puede unirse a las regiones promotoras de sus genes diana, reclutar la maquinaria transcripcional e inducir la expresión génica correspondiente (Figura 4).



**Figura 4.** Vía de señalización clásica del NF- $\kappa$ B. La unión de citocinas proinflamatorias a sus receptores desencadena una cascada de señalización que culmina en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y posterior producción de mediadores inflamatorios. (Modificado de Liu et al, 2017).



### **2.5.1 NF- $\kappa$ B y artritis reumatoide**

En condiciones de inflamación, como en la AR, el NF- $\kappa$ B participa en aspectos importantes para el inicio y progresión de la patología. Se ha demostrado que el NF- $\kappa$ B induce la respuesta tipo Th1, promueve la activación y proliferación de los FS y su participación en la diferenciación y activación de la reabsorción ósea vía la generación de osteoclastos. Todo esto contribuye a la destrucción articular característica en esta enfermedad (74).

En explantes sinoviales de pacientes en etapas tempranas como tardías de la AR se ha detectado la activación de NF- $\kappa$ B principalmente en células endoteliales de la microvasculatura articular y en fibroblastos sinoviales (75). Además, estudios inmunohistoquímicos han mostrado que pacientes con AR presentan un marcaje positivo para las subunidades RelA (p65) y NF- $\kappa$ B1 (p50) en el endotelio vascular y en el revestimiento sinovial en comparación con la ausencia de marca en sujetos sanos (76).

La actividad de NF- $\kappa$ B también depende del tipo de patología inflamatoria. Por ejemplo, se detectó una elevada actividad de unión de NF- $\kappa$ B al ADN en las membranas sinoviales de pacientes con AR en comparación con pacientes con osteoartritis (OA) donde no se observó prácticamente ninguna actividad (77).

En la AR, el inicio del proceso inflamatorio crónico se asocia con el desarrollo de una respuesta autoinmune aberrante la cual promueve la perpetuación de la inflamación y por ende una respuesta descontrolada de la misma. Hay evidencia experimental que demuestra que el NF- $\kappa$ B desempeña un papel fundamental tanto en la fase de inicio como en la fase de perpetuación de la inflamación en la AR (74).

La interacción de células presentadoras de antígeno (CPA) y células T desencadena la activación de NF- $\kappa$ B en ambos tipos celulares mediante la acción de mediadores proinflamatorios como la IL-2 y el interferon gamma (INF- $\gamma$ ) (78, 79). A su vez, los productos secretados por las células T activadas inducen la activación de diferentes tipos macrófagos, FS, células endoteliales, etc, los cuales producen diversos mediadores proinflamatorios necesarios para la perpetuación de la respuesta

inflamatoria (80) (Figura 5). Dentro de estos últimos sobresalen la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en la AR. Ambas citocinas son potentes inductoras de la activación del NF- $\kappa$ B, lo que indica una relación directa entre la activación persistente de NF- $\kappa$ B y los niveles sostenidos de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

<u>INDUCTORES</u>	<u>MOLECULAS EFECTORAS</u>	<u>EFEKTOS</u>
<u>Citocinas</u> IL-1 TNF $\alpha$	TNF $\alpha$ IL-1 IL-6 IL-17	⇒ <u>Inflamación</u>
<u>Receptores de células T</u> CD40L FasL TRANCE/RANKL	IL-8 MCP-1 ICAM-1 VCAM-1 GM-CSF	⇒ <u>Reclutamiento de células inmunes</u>
<u>Factores de crecimiento</u> PDGF bFGF	VEGF COX-2	⇒ <u>Neovascularización</u>
<u>Proteínas virales</u> HTLV-1 tax	iNOS	⇒ <u>Prostaglandinas y producción de óxido nítrico</u>
<u>Productos bacterianos</u> LPS SCW	MMP-1 MMP-3 MMP-9 MMP-13	⇒ <u>Remodelación del tejido</u>
<u>Estrés oxidativo</u>	c-Myc cyclin D	⇒ <u>Proliferación</u>
<u>Isquemia/Reperusión</u>	IEX-1L TRAF 1/2 c-IAP 1/2 XIAP A1/B1-1	⇒ <u>Antiapoptosis</u>

**Figura 5.** Inductores, moléculas efectoras y acciones del NF- $\kappa$ B. bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CD40L: ligando de CD40; COX-2: ciclooxigenasa-2; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible; LPS: lipopolisacárido; MCP-1: proteína quimio atrayente de monocitos 1; RANKL: receptor activador del ligando NF- $\kappa$ B; TRANCE: citocina inducida por la activación relacionada con el TNF; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. (Modificado de Makarov et al, 2001)

### **2.5.2 NF- $\kappa$ B y fibroblastos sinoviales**

La activación de la vía del NF- $\kappa$ B en los FS se traduce en efectos inflamatorios articulares. Los FS participan en la fisiopatología de la AR a través de perpetuar la inflamación de la articulación y favorecer la autoinmunidad (7, 81).

Se ha descrito que los FS poseen un fenotipo tumoral debido a su alta capacidad proliferativa en estadios de inflamación. Durante la inflamación de la articulación, la proliferación de los FS es descontrolada, así como su producción de mediadores de inflamación. La activación de NF- $\kappa$ B media la inducción de la proliferación de los FS vía la expresión de ciclinas como la D1 y de c-Myc. Estudios *in vitro* han demostrado que el factor de crecimiento básico fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y las citocinas como el TGF- $\beta$ , la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  se sobre-expresan en el sinovio de pacientes con AR y estimulan la proliferación de los FS (74, 82, 83). Además, el tratamiento de FS en cultivo con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  activan el complejo IKK que se traduce en la activación de NF- $\kappa$ B y resulta en la expresión de mediadores proinflamatorios (84). De hecho, se ha detectado a las proteínas de la familia de NF- $\kappa$ B en los núcleos de los FS tanto en AR como OA, pero es en la AR donde se observa su mayor concentración (74).

Otra de las características de los FS que se encuentra bajo el control de la activación de NF- $\kappa$ B es su capacidad invasiva que se debe a la transcripción de MMPs y mediadores inflamatorios como la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) capaces de promover la destrucción del cartílago y del hueso (9). Al respecto, destaca la activación de NF- $\kappa$ B inducida por componentes de la matriz extracelular del cartílago al unirse a miembros de la familia de integrinas  $\beta$ 1 presentes en la membrana de los FS (85).

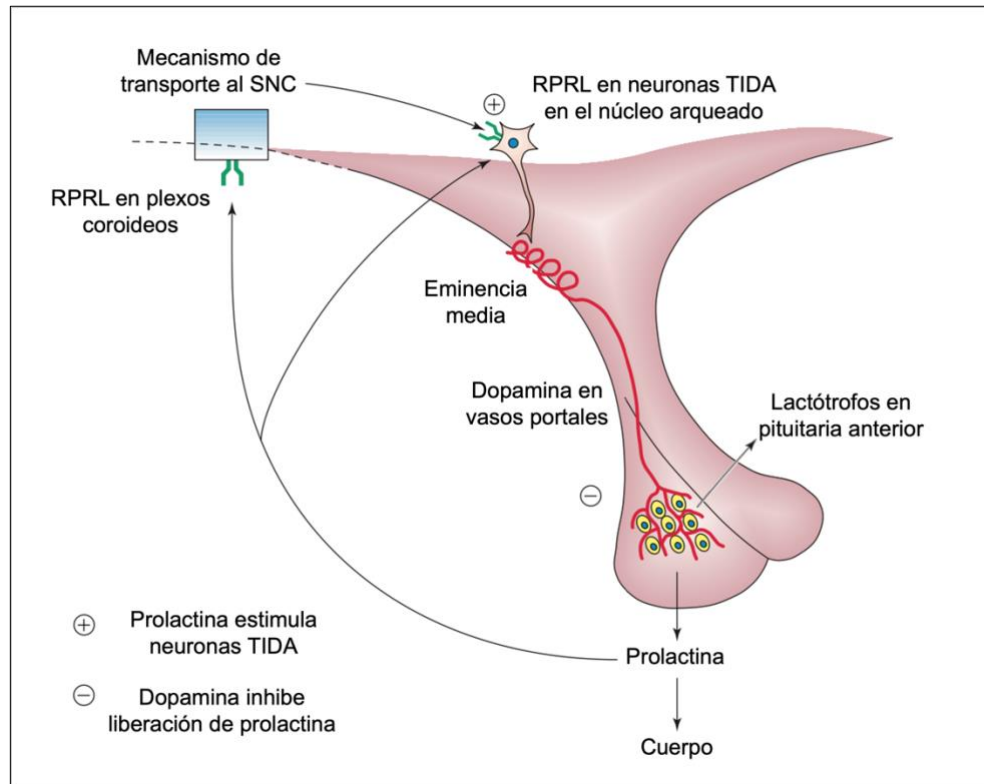
Es por todo esto que los factores capaces de contrarrestar la acción de mediadores inflamatorios sobre activación de NF- $\kappa$ B en los FS tienen relevancia en el control de la inflamación y la destrucción de la articulación. Uno de estos factores es la hormona PRL.

## **2.6 Prolactina**

La PRL es una hormona proteica que, en el humano comprende 199 aminoácidos, sintetizada y secretada por células especializadas (lactotropos) de la adenohipófisis. Esta hormona ejerce una multiplicidad de efectos dentro y fuera de la esfera reproductiva que incluyen acciones sobre el crecimiento, el metabolismo, la osmorregulación, el comportamiento, la función neural, la angiogénesis y la respuesta inmune (11, 21, 86-89).

### **2.6.1 Mecanismo de secreción y regulación**

La secreción de PRL está predominantemente bajo el control inhibitorio de la dopamina, la cual se produce por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) ubicadas en el núcleo arqueado del hipotálamo (88). La dopamina es liberada en la eminencia media hacia el sistema porta hipotálamo-adenohipofisario que la transporta a la adenohipófisis, donde ejerce un control tónico inhibitorio de la secreción de PRL a través de activar sus receptores D2 presentes en la membrana de los lactotrópos adenohipofisarios (Figura 6). A su vez, la prolactina retroalimenta negativamente su propia secreción a través de estimular la producción de dopamina por el sistema TIDA vía su receptor presente en dichas neuronas y la subsecuente activación de la señalización JAK-STAT (88).



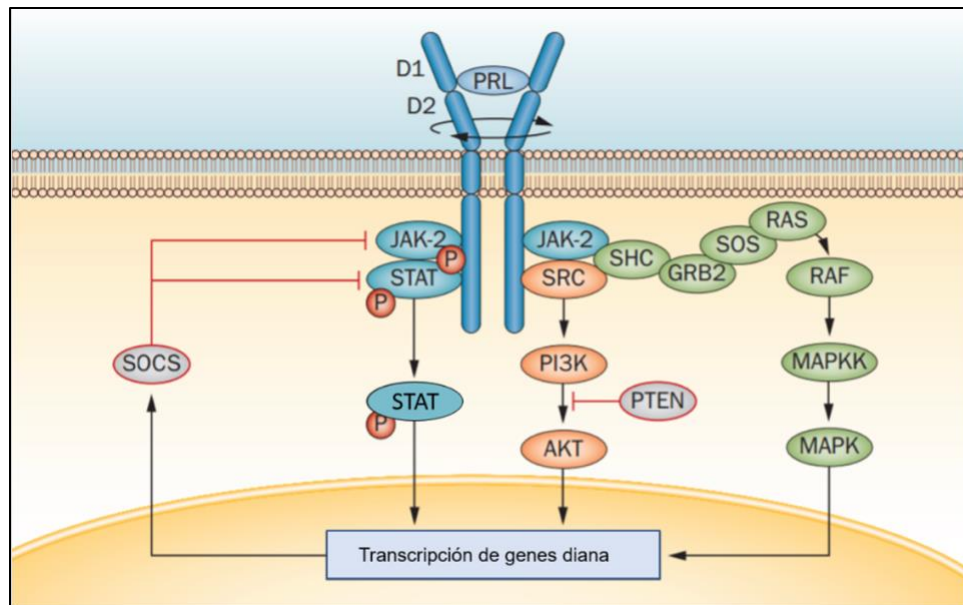
**Figura 6.** Regulación de la secreción de PRL. La secreción de prolactina está inhibida tónicamente por el hipotálamo mediante la dopamina secretada en la eminencia media por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA). Posteriormente, la prolactina regula su propia secreción al estimular los receptores de prolactina (RPRL) en las neuronas TIDA. La prolactina puede acceder directamente a estas neuronas a través de capilares fenestrados en la eminencia media o después de ingresar al sistema nervioso central (SNC) mediante un mecanismo de transporte mediado por transportadores en el plexo coroideo. (Modificado de Grattan et al, 2002)

### 2.6.2 Vía de señalización

Las diversas acciones de la PRL están mediadas por la interacción con su receptor membranal (RPRL), que se expresa en muchos tipos de células y pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1 (88). Existen varias formas del RPRL

que, de acuerdo a la extensión de su dominio intracitoplásmico, se definen como largo (85-90 kDa) (90) intermedio (65 kDa) y corto (42 kDa) (91).

La vía canónica de señalización activada por PRL es la vía JAK / STAT, que es comúnmente utilizada por los receptores de eritropoyetina, IL-6 y otros miembros de la familia de citocinas clase 1. La señalización de la PRL comienza a partir de la dimerización del RPRL, esta interacción activa la cinasa de tirosina JAK2 (*Janus Kinase 2*) que fosforila residuos de tirosina en la porción intracelular del receptor, lo que permite el anclaje y posterior fosforilación/activación (por JAK2) de factores de transcripción STAT (*Signal Transduction Activators of Transcription*) que conlleva a su dimerización y translocación al núcleo donde los dímeros STAT se unen a regiones promotoras de genes específicos (88, 89, 91-93). Además de esta vía canónica de señalización, existen algunas otras como la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la de la fosfoinositol 3-cinasa / Akt (PI-3K / Akt) que también contribuyen a los efectos de la PRL (Figura 7).



**Figura 7.** Vía de señalización de la PRL. Se presentan las principales cascadas de señalización desencadenadas por la isoforma larga del RPRL, culminando en la inducción de la transcripción de distintos tipos de genes. (Modificado de Bernard et al, 2005).

### **2.6.3 Dualidad de efectos de la prolactina en la artritis reumatoide**

La AR es una enfermedad que afecta predominantemente a las mujeres frente a los hombres en una relación 3:1, lo que sugiere que las hormonas ligadas al sexo tienen relevancia en la aparición y desarrollo de la enfermedad. Entre estas hormonas se encuentra la PRL, una hormona sexualmente dimórfica que posee acciones sobre los tejidos de la articulación y sobre las células inmunes (11). En este sentido se ha buscado dilucidar la participación de la PRL en el desarrollo de la AR; sin embargo, los estudios son aún controversiales.

Por muchos años se consideró que la PRL ejercía una influencia negativa debido a que algunos pacientes con AR presentan niveles circulantes de PRL más altos de lo reportado en sujetos sanos u osteoartríticos. Estos niveles aún cuando son mayores se encuentran dentro del intervalo fisiológico normal ( $\leq 20$  ng / ml) (94). Sin embargo, no se encontró una relación clara entre los niveles de PRL y la severidad de la AR (95). Además, el uso de agonistas y antagonistas dopaminérgicos, los cuales elevan y reducen los niveles circulantes de la PRL, respectivamente, han generado un panorama confuso al reportar relaciones contradictorias. Por ejemplo, la bromocriptina, un agonista de la dopamina que inhibe la secreción de la PRL a la circulación, tanto suprimió (96) como exacerbó (11) la artritis inducida por colágeno. Los efectos opuestos de la PRL podrían estar relacionados con sus niveles sistémicos, pero también con la PRL sintetizada localmente por tejidos de la articulación (11). El tratamiento con PRL en dosis bajas y altas se ha asociado con efectos proinflamatorios y antiinflamatorios, respectivamente, sobre leucocitos en cultivo y sobre células del bazo *in vivo* (17, 97, 98). Además, se ha visto que la concentración de PRL se modifica por la exposición a condiciones inflamatorias (11).

En apoyo al efecto antiinflamatorio de la PRL, estudios de nuestro laboratorio mostraron que la hiperprolactinemia reduce la inflamación articular, la producción local de citocinas proinflamatorias (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-1 $\beta$ ) y la consecuente destrucción del cartílago (8) y hueso (9) en el modelo de artritis inducida por

adyuvante completo de Freund en roedores. Además, se reportó que los FS pueden ser blanco de las acciones protectoras de la PRL, ya que los cultivos primarios de FS expresan el RPRL y la PRL inhibe la expresión de mediadores de inflamación inducida por una combinación de citocinas proinflamatorias (INF $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y IL-1 $\beta$ ) en FS en cultivo (9). Sin embargo, recientemente obtuvimos evidencias preliminares de que la PRL también puede actuar sobre los FS promoviendo procesos inflamatorios. Los efectos opuestos se manifestaron cuando la PRL se adiciona a los FS incubados solamente con IL-1 $\beta$  o con TNF- $\alpha$ . Si bien ambas citocinas estimularon su autoproducción y la de otros mediadores de inflamación (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, MMP) por los FS, su interacción con PRL tuvo efectos contrastantes. La PRL inhibió el efecto proinflamatorio de la IL-1 $\beta$ , pero estimuló la acción proinflamatoria del TNF- $\alpha$ . Estos hallazgos sugirieron que acciones opuestas de la PRL sobre los FS resultan de su interacción diferencial con citocinas proinflamatorias y que este modelo permite el estudio de los mecanismos involucrados.



### **3. Justificación**

La AR es una patología de alta prevalencia que afecta considerablemente la calidad de vida de los pacientes y que requiere de mejores tratamientos. La PRL se ha asociado con la progresión de la AR; sin embargo, su influencia es controversial dado que estudios clínicos y preclínicos han reportado relaciones y efectos hormonales tanto positivos como negativos. En este estudio se abordan posibles mecanismos de las acciones opuestas de la PRL sobre los procesos inflamatorios de tejidos de la articulación. Esta información permitirá entender mejor la participación de la PRL en la patofisiología de la AR.

## **4. Hipótesis**

Los efectos opuestos de la PRL sobre la inflamación de la articulación dependen del tipo de citocina proinflamatoria involucrada, del nivel de expresión del RPRL y/o de la activación diferencial de la vía de NF- $\kappa$ B.

## **5. Objetivos**

### **5.1 General**

Analizar los mecanismos de acción de la PRL sobre la respuesta inflamatoria de tejidos de la articulación.

### **5.2 Particulares**

A. Caracterizar las acciones duales de la PRL sobre el efecto proinflamatorio de la IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$  en los FS.

B. Determinar el nivel de expresión del receptor de la PRL en los FS por acción de la IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$ .

C. Investigar si la PRL modifica en forma diferencial la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en respuesta a la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ .

D. Analizar si los efectos diferenciales de la PRL se manifiestan *in vivo* en un modelo agudo de inflamación articular inducido por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

## **6. Metodología**

### **6.1 Diseño experimental**

El estudio *in vitro* utilizó FS aislados de la membrana sinovial de ratones C57BL/6 en pasaje 3 que se incubaron con 1 ng/mL de IL-1 $\beta$  o 10 ng/mL TNF- $\alpha$  en presencia o ausencia de 2.3  $\mu$ g/mL de PRL ovina durante 24 horas. Como parámetros se evaluó la actividad metabólica, la proliferación, la expresión génica y proteica de factores inflamatorios, la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y sus mecanismos regulatorios. Para el estudio *in vivo* se empleó un modelo agudo de inflamación articular donde se inyectaron ratones macho y hembras C57BL/6 en el espacio articular de ambas articulaciones de la rodilla con IL-1 $\beta$  (80 ng) o TNF- $\alpha$  (300 ng) en ausencia o presencia de PRL (2  $\mu$ g) en un volumen final de 10  $\mu$ L. Se utilizó solución salina fisiológica (10  $\mu$ L) como vehículo. 24 horas después de la inyección del vehículo o de las citocinas, los animales se sacrificaron en una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub>. Se obtuvieron las articulaciones inyectadas para evaluar la expresión de genes proinflamatorios (*Il1b*, *Inos* e *Il6*) y del receptor de PRL (*Rprl*).

### **6.2 Materiales**

La PRL ovina se obtuvo del Programa de Hormonas y Pituitaria de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NHPP, Torrance, CA). La interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) se obtuvieron de R & D Systems (Minneapolis, MN); el inhibidor de las quinasas I $\kappa$ B, BAY 11-7085, de Calbiochem (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); los anticuerpos policlonales anti-PRLR, anti-p65, anti-I $\kappa$ B- $\beta$  y anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano (HP) de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

### **6.3 Animales**

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos y hembras (de 4 a 6 semanas y 8 semanas de edad para estudios *in vitro* y estudios *in vivo*, respectivamente). En las hembras se monitoreó el ciclo estral diariamente mediante la citología vaginal, realizando los experimentos en la etapa de diestro (8:00 a 10:00 AM). Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (ciclos de luz y oscuridad de 12

horas), temperatura (22 °C) y alimento (*ad libitum*) de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (Octava Edición, National Academy Press, Washington, D.C., EE. UU.). El Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México aprobó todos los experimentos realizados (protocolo 033).

#### **6.4 Extracción de fibroblastos sinoviales**

Los FS se aislaron y cultivaron siguiendo el protocolo establecido (99). Las extremidades posteriores, a nivel de la articulación fémur/fíbula/tibia se diseccionaron, lavaron y sumergieron en solución salina balanceada de Hank donde se removió todo el tejido alrededor del hueso (piel, tendón y músculo) teniendo la precaución de no lesionarlo para evitar la contaminación con células de la médula ósea. La articulación de la rodilla se abrió para exponer el tejido sinovial y se incubó en medio de cultivo (DMEM alto en glucosa suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina) adicionado con 2 mg/mL de colagenasa tipo IV y 0.2 mg/mL de desoxiribonucleasa 1 en agitación (300rpm) por 3 horas a 37°C. El tejido se agitó vigorosamente y el sobrenadante se filtró a través de una malla de 100 a 200  $\mu\text{m}$  y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en DMEM 20% SFB y se cultivó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr su confluencia. Los FS se usaron en el pase 3 bajo una confluencia del 90-100% que es cuando muestran su fenotipo característico (CD90.2+, VCAM+, ICAM+).

#### **6.5 Ensayo de actividad metabólica (MTT)**

El ensayo de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio) se llevó a cabo como se describió previamente (100). El reactivo MTT se disolvió en amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7,2) a una concentración de 5 mg/mL y se filtró a través de una membrana de 0.20  $\mu\text{m}$ . Los FS se sembraron a una densidad de  $3.5 \times 10^4$  por pozo en placas de 96 y se incubaron con o sin PRL ovina (2.3  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) durante 72 horas en 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (1% SFB-DMEM). Tras el tratamiento, se añadieron

10  $\mu\text{L}$  de la solución madre de MTT a cada pozo y la reacción se incubó durante 4 horas a 37 °C. Se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de solubilización (dodecil sulfato de sodio al 10% disuelto en 0.01 N HCl) a cada pozo. Tras la incubación de una noche, se evaluó la absorbancia (570 nm) en un lector de ELISA. Los resultados se representaron como veces de cambio con respecto al control sin tratamiento con citocinas.

### **6.6 Ensayo de proliferación (click)**

El ensayo de proliferación se realizó de acuerdo con el protocolo establecido (101). Se sembraron 2000 FS en pozos de 0.33  $\text{cm}^2$ . Una vez que las células se adhirieron, se incubaron en ausencia (control) o en presencia de PRL ovina (2.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en combinación o no de IL-1 $\beta$  (1  $\text{ng}/\text{mL}$ ) o TNF- $\alpha$  (10  $\text{ng}/\text{ml}$ ) durante 72 horas. Después de las 72 horas de tratamiento se trataron con un análogo de timidina por 24 horas y se cuantificaron aquellas células con ADN recién sintetizado mediante la reacción de click. Brevemente, las células se trataron con 10  $\mu\text{M}$  de un análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (Sigma-Aldrich) durante 24 horas bajo distintos tratamientos. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 durante 1 hora. Entre cada uno de los pasos se realizaron lavados con TBS 1X durante 2 minutos bajo agitación. La presencia de EdU en el ADN recién sintetizado se detectó mediante su marcaje durante 20 minutos con una azida fluorescente y la reacción de click que consiste en la combinación en fresco de 100 mM Tris, 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$ , 50 mM ácido ascórbico y 20  $\mu\text{M}$  Azida Fluor 545 (Sigma-Aldrich) seguidos por lavados de 2 y 30 minutos con 0.5% TritonX-100 - TBS 1X. El ADN se tiñó con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bisBenzimida Hoescht 33342 trihidroxicloruro (Sigma-Aldrich) (102). Las imágenes se digitalizaron en un microscopio invertido de fluorescencia y se analizaron utilizando el programa ImageJ (103).

### **6.7 Ensayo de apoptosis (ELISA)**

La apoptosis se evaluó utilizando el kit de ELISA para la detección de la muerte celular (Número de catálogo # 11544675001, RRID: AB\_3068343 Roche, Basilea, Suiza). Los FS se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en placas de 24

pocillos, en ausencia (control) o presencia de PRL (2.3 µg/mL), IL-1β (1 ng/mL) o TNF-α (10 ng/mL) durante 24 horas en 100 µL de DMEM con 1% de suero fetal bovino (SFB). Las células se tripsinizaron, centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se resuspendieron con 250 µL de amortiguador de incubación a una densidad de  $1 \times 10^5$  células, incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos y luego se sometieron a centrifugación a 20,000g durante 10 minutos. El sobrenadante se recolectó y diluyó en una proporción de 1:5 con amortiguador de incubación. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia de los fragmentos de ADN asociados a histonas se midió a 405 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

## ***6.8 Expresión del ARNm de marcadores moleculares de inflamación***

### ***6.8.1 Extracción de ARN***

Los FS se sembraron a confluencia en placas de 6 pozos y, una vez que las células se adhirieron a la placa, se estacionaron con DMEM adicionado con 1% de SFB durante 16 horas y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de PRL ovina (2.3 µg/mL) en combinación o no de IL-1β (1 ng/mL) o TNF-α (10 ng/mL) durante 24 horas. Para extraer el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se adicionaron 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY) a cada pozo (placas de 12 pozos) y se recuperó el raspado celular en tubos eppendorf de 1.5 mL que se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para disociar los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol adicionado, la mezcla se agitó, se incubó a temperatura ambiente 3 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 minutos a 4 °C. Se recuperó el ARN presente en la fase superior o fase acuosa e inmediatamente se adicionaron 0.5 mL de alcohol isopropílico por cada mL de TRIzol, se agitó vigorosamente, se incubó 24 horas a -20°C y se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 minutos a 4 °C. La mezcla se decantó teniendo cuidado de no eliminar el precipitado y se lavó con 0.5 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el etanol por decantación y se volvió a centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm. El precipitado se dejó secar y se diluyó con 18 µL de agua libre de nucleasas. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

### 6.8.2 Síntesis de ADNc

El ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN extraído utilizando reactivos (la enzima transcriptasa reversa (1 µL por reacción), solución amortiguadora (2 µL por reacción), deoxinucleótidos (0.8 µL por reacción), los oligonucleótidos (2 µL por reacción) y agua libre de nucleasas) y procedimientos (incubación por 2 horas a 37 °C) especificados por el fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). El ADNc se diluyó con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 10 ng/µL y se almacenó a 4°C.

### 6.8.3 qRT-PCR

La PCR en tiempo real se realizó mediante 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 µL (5 µL de cDNA, 4.5 µL de SYBR Green y 0.5 µM de primers sentido y antisentido). La amplificación de la muestra incluyó un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de amplificación (10 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura de apareamiento específica del par de cebadores y 30 segundos a 72 °C). Se utilizó el método 2-ΔΔCT para calcular los niveles de expresión de mRNA. El nivel de expresión se normalizó a la expresión del gen constitutivo que codifica para la hipoxantina-guanina fosforiltransferasa (hprt). La expresión basal del gen constitutivo se normalizó a 1.

**Tabla 1.** Secuencia de oligonucleótidos

Gen	Sentido	Antisentido	T. de alineación °C
HPRT	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2
RPRL	ACACGCGCAGATCTCCTTACCA	CCCCTTCTTGACAGCCACTT	56.2
IL-1β	GTTGATTCAAGGGGACATTA	AGCTTCAATGAAAGACCTCA	60.2
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	60.2
TNFα	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	60.2
iNOS	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	60.2
IL1R1	AAATAAAATGCACGGCGACA	TAACACAAGCCAGGGTCATT	60.7
TNFR2	AGATGTGCTGTGCTAAGTGT	ACACTCGGTTCTGCTGTTTA	56.8
TNFR1	GTCGAAAGAAATGTCCCA	TCTCAGAAAGAACCCTGCAT	56.8

### **6.9 ELISA de IL-6**

Los FS se sembraron en confluencia en placas de 6 pozos, se estacionaron con 1% SFB-DMEM durante 16 horas y se trataron con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) en ausencia (control) o presencia de PRL ovina (2.3  $\mu$ g/mL) durante 24 horas. Se recolectaron los sobrenadantes tras el tratamiento y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de las pruebas. Los sobrenadantes se analizaron con el kit de ELISA DuoSet de IL-6 de ratón (R&D Systems DY406-05) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.10 Western blot**

Para evaluar al RPRL, los FS se sembraron a confluencia en placas de 6 pozos, se estacionaron con 1% SFB-DMEM durante 16 horas y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de PRL ovina (2.3  $\mu$ g/mL) en combinación o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) durante 24 horas. Para evaluar a las I $\kappa$ Bs, las células se estacionaron durante 16 horas y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de PRL ovina (2.3  $\mu$ g/mL) durante 45 minutos y con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) durante los últimos 15 minutos. Al cabo de la incubación, se adicionaron 80  $\mu$ L de RIPA a cada pozo (placas de 6 pozos) y el extracto celular se sonicó (5 segundos, 30% de amplitud máxima) y centrifugó (15 minutos a 10,000 rpm a 4 °C). La concentración de proteína total se determinó por el método de Bradford. Los extractos (60  $\mu$ g de proteína) se procesaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (10-15%) bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras y las proteínas se transfirieron (a 23 mV durante 60 minutos) a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), se incubaron por la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (anti-PRLR (1:500, Catalog # Sc-377098, RRID: AB\_2940846, Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:500, Catalog # Sc-847, RRID: AB\_2151439, Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ B- $\beta$  (1:500, Catalog # Sc-945, RRID: AB\_631696, Santa Cruz Biotechnology), o anti- $\beta$ -Tubulina (1:1000, Catalog # Ab6046, RRID: AB\_2210370, Abcam), se lavaron (5 veces en PBS-Tween-20 por 5 minutos) y se incubaron con anticuerpos secundarios (1:5000, por Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) acoplados a peroxidasa



o fosfatasa alcalina (2 horas a TA) y la detección se realizó mediante quimioluminiscencia (400-600 nm) o colorimetría.

### **6.11 Ensayo de translocación nuclear de NF- $\kappa$ B**

El ensayo de translocación nuclear de NF- $\kappa$ B se realizó de acuerdo al método reportado (104). Los FS ( $5 \times 10^4$ ) se sembraron en cubreobjetos estériles en ausencia (control) o presencia de PRL (2.3  $\mu$ g/mL) por 45 minutos y con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) durante los últimos 15 minutos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se bloquearon con 1% BSA, 5% NGS, 0.05% Tritón X-100, PBS durante 1 hora a TA. Entre cada paso se realizaron lavados con PBS durante 2 minutos bajo agitación. Las preparaciones se incubaron con el anticuerpo anti-p65 (1:1000) (SC-109, Santa Cruz) por la noche a 4°C, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500) (ab150077, Abcam) durante 2 horas a TA. Por último, las preparaciones se lavaron con PBS, se montaron en un portaobjetos con vectashield y se sellaron con barniz. Las imágenes se digitalizaron en un microscopio invertido de fluorescencia a una magnificación de 60X y se analizaron utilizando el programa ImageJ (103).

### **6.12 Histología y evaluación de infiltrados inmunes**

Utilizamos el procedimiento previamente reportado (9). Las articulaciones de la rodilla se fijaron durante 48 horas en formaldehído al 10% en PBS (pH 7.4), se descalcificaron en EDTA al 14% en PBS durante 21 días, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Secciones mediales de siete micrómetros de grosor de las articulaciones se tiñeron con la solución de hematoxilina y eosina de Harris para evaluar cambios anatómicos e infiltración de las células inmunes. Las imágenes se capturaron con Image-Pro Plus v 5.1.1 (Media Cybernetics Inc.) a una ampliación de  $\times 400$  y  $\times 600$  para identificar y cuantificar las células mononucleares y polimorfonucleares.

### **6.13 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software de GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Las diferencias entre 2 grupos se evaluaron mediante el análisis de t de Student para datos paramétricos. Las diferencias entre

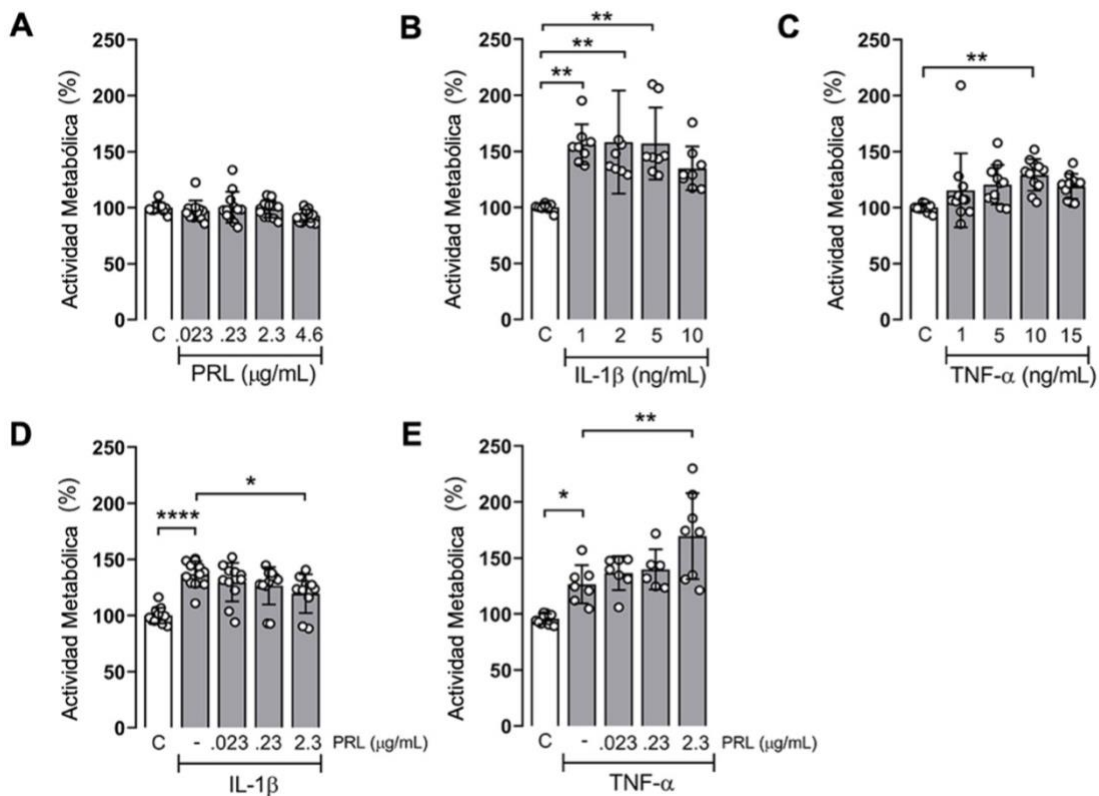
3 o más grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc Tukey para los experimentos *in vitro* y un post-hoc de LSD Fisher para los experimentos *in vivo*. Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0.05$ .

## **7. Resultados**

### **7.1 La PRL inhibe o estimula la actividad metabólica inducida por la IL-1 $\beta$ o el TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente**

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de PRL, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  sobre la actividad metabólica de los FS determinada mediante del ensayo de MTT. Ninguna de las concentraciones de la PRL modificó este parámetro (Figura 8A). En contraste, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  estimularon la actividad metabólica a partir de las concentraciones de 1 ng/mL y 10 ng/mL, respectivamente (Figura 8B y C). Dado que 1 ng/mL de IL-1 $\beta$  y 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  fueron las dosis más bajas con actividad y que dichas concentraciones inducen respuestas inflamatorias en diversos ensayos celulares (105, 106), optamos por utilizar estas concentraciones en todos los estudios subsecuentes.

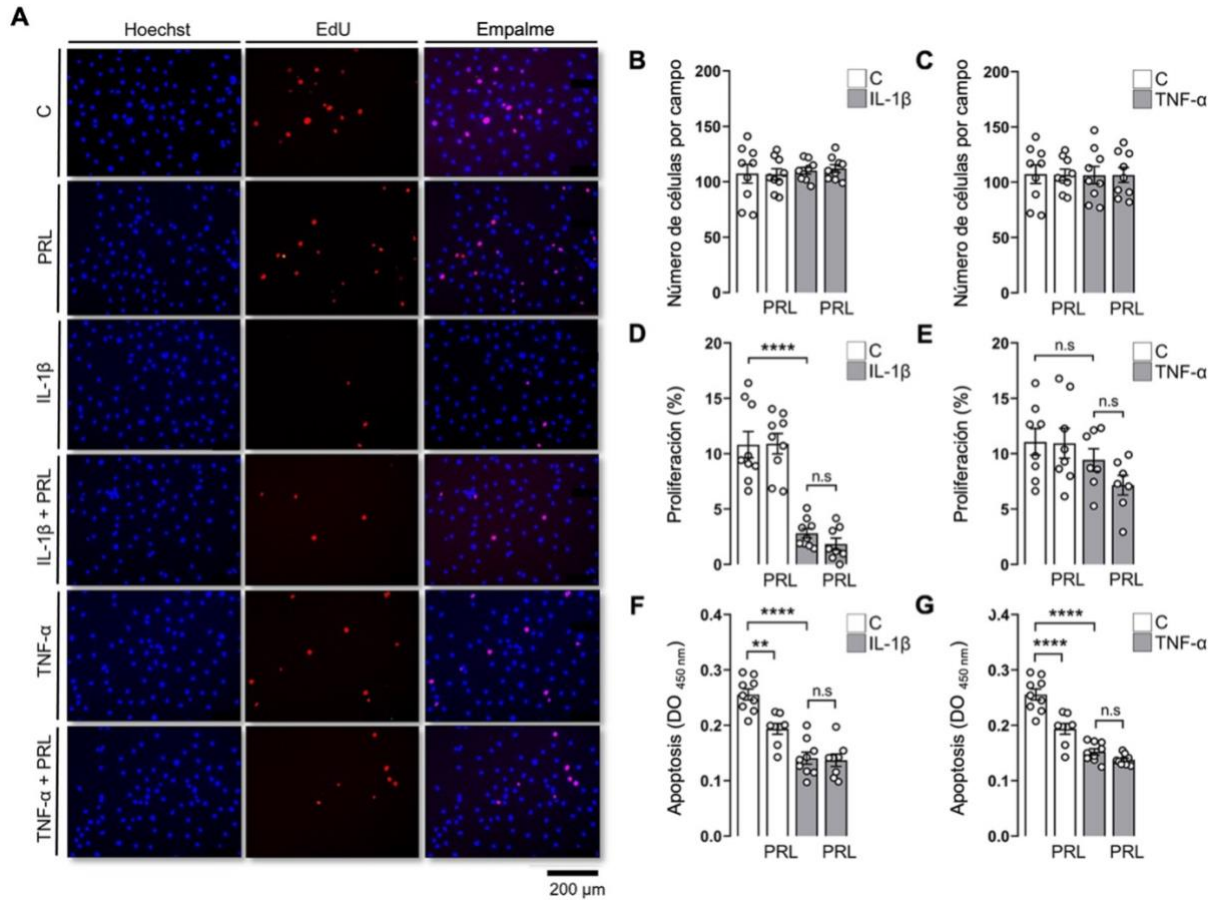
Con el objetivo de evaluar si la PRL modifica el aumento en la actividad metabólica celular de los FS frente a la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , incubamos a los FS durante 72 horas con cada una de las citocinas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de PRL (0.023, 0.23 y 2.3  $\mu$ g/mL). Encontramos que la PRL ejerce un efecto dual sobre la actividad metabólica de los FS en función del tipo de citocina utilizada. El tratamiento con 2.3  $\mu$ g/mL de PRL disminuyó el aumento en la actividad metabólica inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 8D) pero lo incrementó en respuesta a TNF- $\alpha$  (Figura 8E). Estos resultados indican que la PRL ejerce efectos opuestos sobre los FS dependiendo del estímulo proinflamatorio al que se someten.



**Figura 8.** La PRL inhibe o estimula el aumento en la actividad metabólica inducida por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente. Actividad metabólica de los FS cultivados en ausencia (control [C]) o presencia de diferentes concentraciones de PRL (A), IL-1 $\beta$  (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) más diferentes concentraciones de PRL (D), y TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) más diferentes concentraciones de PRL (E). La actividad metabólica se determinó mediante el ensayo de MTT. Los valores individuales se muestran con círculos abiertos. Los valores se normalizaron con el Control (C) y corresponden a la media  $\pm$  SEM ( $n = 8-12$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

## **7.2 Los efectos duales de la PRL no se asocian con cambios en la supervivencia o proliferación de fibroblastos sinoviales de ratones macho.**

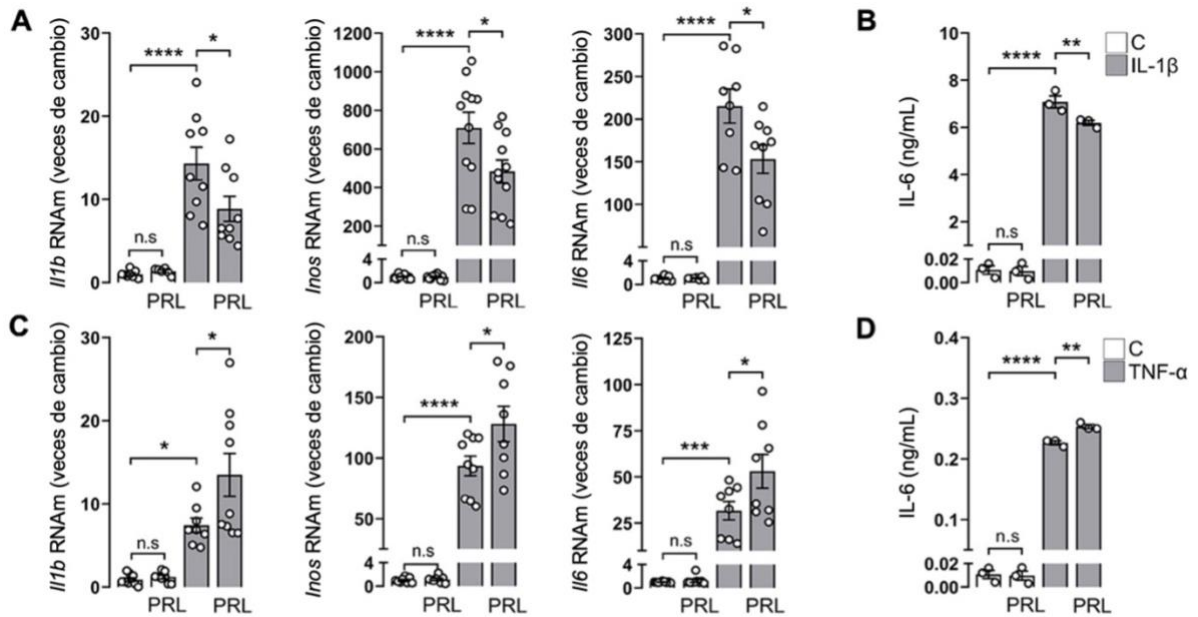
Dado que la actividad metabólica puede reflejar cambios en la supervivencia y proliferación celular, se cuantificó el número y la síntesis de ADN de los FS mediante tinción de ADN (Hoechst) e incorporación de Edu-ADN (reacción de click), respectivamente (Figura 9A). No hubo diferencia en el número de FS después del tratamiento con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , con o sin PRL (Figura 9A-C). Sin embargo, la proliferación de FS se redujo 4 veces después del tratamiento con IL-1 $\beta$  (Figura 9A y 9D), un hallazgo inesperado dado que los FS muestran un fenotipo proliferativo en condiciones inflamatorias (7). No obstante, ni el TNF- $\alpha$  ni la PRL modificaron la proliferación de los FS (Figura 9A y 9E). La supervivencia de los FS se analizó directamente mediante un ensayo de detección de muerte celular que evalúa fragmentos de ADN asociados a histonas presentes en el citoplasma de células en apoptosis. La PRL, la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$  redujeron la apoptosis de los FS, pero la PRL no modificó el nivel de apoptosis inducido por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  (Figura 9F y 9G). Concluimos que el aumento en la actividad metabólica de los FS después de incubar con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  no se debió a la regulación al alza de la proliferación y la supervivencia, y, por lo tanto, las acciones duales de PRL operan a un nivel celular diferente.



**Figura 9.** Los efectos duales de la PRL no se asocian con cambios en la supervivencia o proliferación de los fibroblastos sinoviales de ratones macho. **(A)** Micrografías representativas que muestran FS teñidos para el ADN total (Hoescht) o recién sintetizado (EdU), así como el empalme de ambas fotografías (empalme). Barra de calibración = 200 μm. Las gráficas muestran el número de células por campo y el porcentaje de FS en proliferación incubados o no con IL-1β (1 ng/mL) **(B y D)** o TNF-α (10 ng/mL) **(C y E)** en ausencia o presencia de PRL (2.3 μg/mL) durante 72 horas. La apoptosis se midió mediante la absorbancia (405 nm) de fragmentos de ADN en FS incubados o no con IL-1β (1 ng/mL) **(F)** o TNF-α (10 ng/mL) **(G)** en ausencia o presencia de PRL (2.3 μg/mL) durante 24 horas. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias ± SEM (n = 8-9). n.s.: no significativo, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001 (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### **7.3 La PRL inhibe o estimula la expresión de mediadores proinflamatorios en fibroblastos sinoviales de ratones macho en respuesta a IL-1 $\beta$ o TNF- $\alpha$ , respectivamente.**

Evaluamos si la PRL ejerce efectos antagónicos sobre la expresión de los genes *Il1b*, *Inos* e *Il6*, y sobre la síntesis de IL-6 inducida por la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . Consistentemente con lo reportado en la literatura (36, 107-109), la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  aumentaron la expresión de los genes *Il1b*, *Inos* e *Il6* (Figura 10A y 10C) y de la proteína de IL-6 (Figura 10B y 10D). Consistentemente con los efectos sobre la actividad metabólica, la PRL ejerció efectos opuestos sobre la expresión y producción de las citocinas dependiente del tipo de citocina utilizada. La PRL disminuyó el aumento de *Il1b*, *Inos* e *Il6* en respuesta a la IL-1 $\beta$  (Figura 10A) y la incrementó frente al TNF- $\alpha$  (Figura 10B). Los efectos duales de la PRL se confirmaron al cuantificar los niveles secretados de la IL-6. La PRL redujo e incrementó los niveles de la IL-6 en el medio condicionado de los FS co-incubados con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente (Figura 10B y 10D). Estos hallazgos muestran que la PRL ejerce acciones duales en la respuesta inflamatoria de los FS que son específicas de citocinas e incentivaron la búsqueda de los mecanismos responsables.

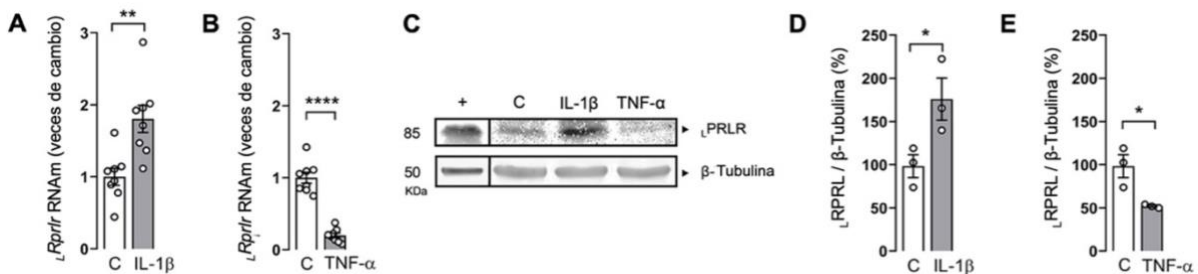


**Figura 10.** La PRL inhibe o estimula la expresión de mediadores proinflamatorios en fibroblastos sinoviales de ratones macho en respuesta a IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , respectivamente. Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de los genes que codifican a IL-1 $\beta$  (*Il1b*), iNOS (*Inos*) e IL-6 (*Il6*), así como la concentración de IL-6 en los FS incubados o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (**A, B**) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (**C, D**) en ausencia o presencia de PRL (2.3  $\mu$ g/mL). La expresión de ARNm se normalizaron al gen constitutivo (*Hprt*) y se expresó en relación al control no tratado (C). El ensayo de ELISA cuantificó la proteína de IL-6 en los medios condicionados de los FS. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 3-12$ ). ns: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).



#### 7.4 La IL-1 $\beta$ aumenta y el TNF- $\alpha$ disminuye la expresión del receptor largo de PRL en fibroblastos sinoviales de ratones macho.

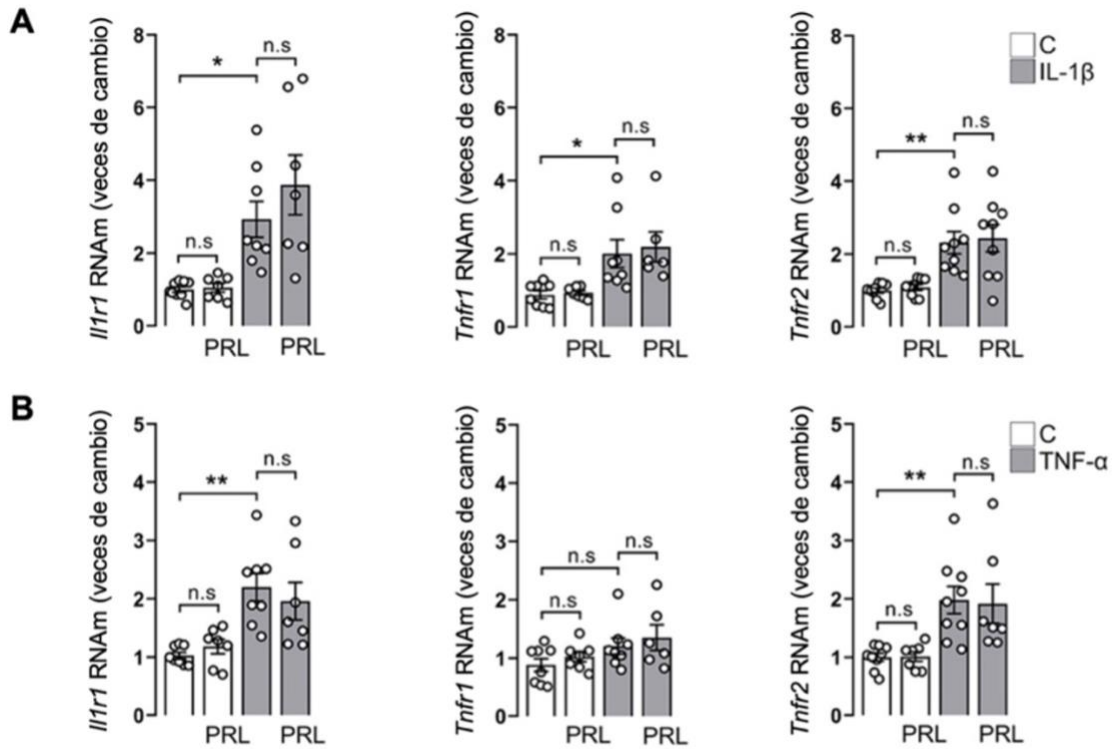
Determinamos la expresión del ARNm y de la proteína correspondiente a la isoforma larga del RPRL ( $\text{LRPRL}$ ). La isoforma larga es la responsable de las acciones biológicas de la PRL en el ratón (110, 111). Encontramos que la IL-1 $\beta$  aumenta de manera significativa tanto la expresión del ARNm (Figura 11A) como de la proteína (Figura 11B) del  $\text{LRPRL}$  y que, de manera contraria, el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión del ARNm (Figura 11A) y de la proteína (Figura 11B). Estos resultados apoyan la relación funcional dual de la PRL con la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en los FS y sugieren que en el mecanismo de estos efectos participa la regulación diferencial del nivel del  $\text{LRPRL}$  en respuesta a dichas citocinas. Así, es posible que la mayor expresión del  $\text{LRPRL}$  influya sobre los efectos antiinflamatorios de la hormona frente a la IL-1 $\beta$ , mientras que la disminución del RPRL interfiera con la señalización de PRL y, por ende, impida una acción antiinflamatoria hormonal frente al TNF- $\alpha$ .



**Figura 11.** La IL-1 $\beta$  aumenta y el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión del receptor  $\text{LRPRL}$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho. Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) del gen que codifica el receptor  $\text{LRPRL}$  ( $\text{LRprlr}$ ) en FS incubados o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (A) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (B). La expresión de ARNm se normalizó al gen constitutivo ( $Hprt$ ) y se expresó en relación con el control no tratado (C). (C) Western blot representativo que muestra el receptor  $\text{LRPRL}$  en FS incubados o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Se utilizó un extracto de hígado de ratón embarazado como control positivo (+). Las barras muestran la cuantificación densitométrica del  $\text{LRPRL}$  normalizado para  $\beta$ -tubulina después del tratamiento con IL-1 $\beta$  (D) o TNF- $\alpha$  (E). Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 3-8$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (prueba  $t$  de Student).

### **7.5 La PRL no modifica la expresión de los receptores de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho.**

Debido a que las citocinas aumentan o disminuyen el RPRL, y que la PRL modula de manera diferencial la expresión de mediadores inflamatorios, evaluamos si la PRL ejerce sus acciones anti o proinflamatorias mediante la regulación transcripcional de los receptores de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Como se describe en diferentes modelos *in vitro* (112, 113) la IL-1 $\beta$  aumentó la expresión de *Il1br*, *Tnfr1* y *Tnfr2*, y el TNF- $\alpha$  estimuló la expresión de *Il1br* y *Tnfr2* (Figura 12A y 12B). Sin embargo, la PRL no modificó la expresión del ARNm de estos receptores en ausencia o presencia de cualquiera de las citocinas (Figura 12A y 12B). Con el propósito de profundizar en el mecanismo de las acciones opuestas de la PRL sobre la respuesta inflamatoria de los FS, investigamos si esta hormona era capaz de modificar la activación de la vía del NF- $\kappa$ B en respuesta a la IL-1 $\beta$  y al TNF- $\alpha$ .

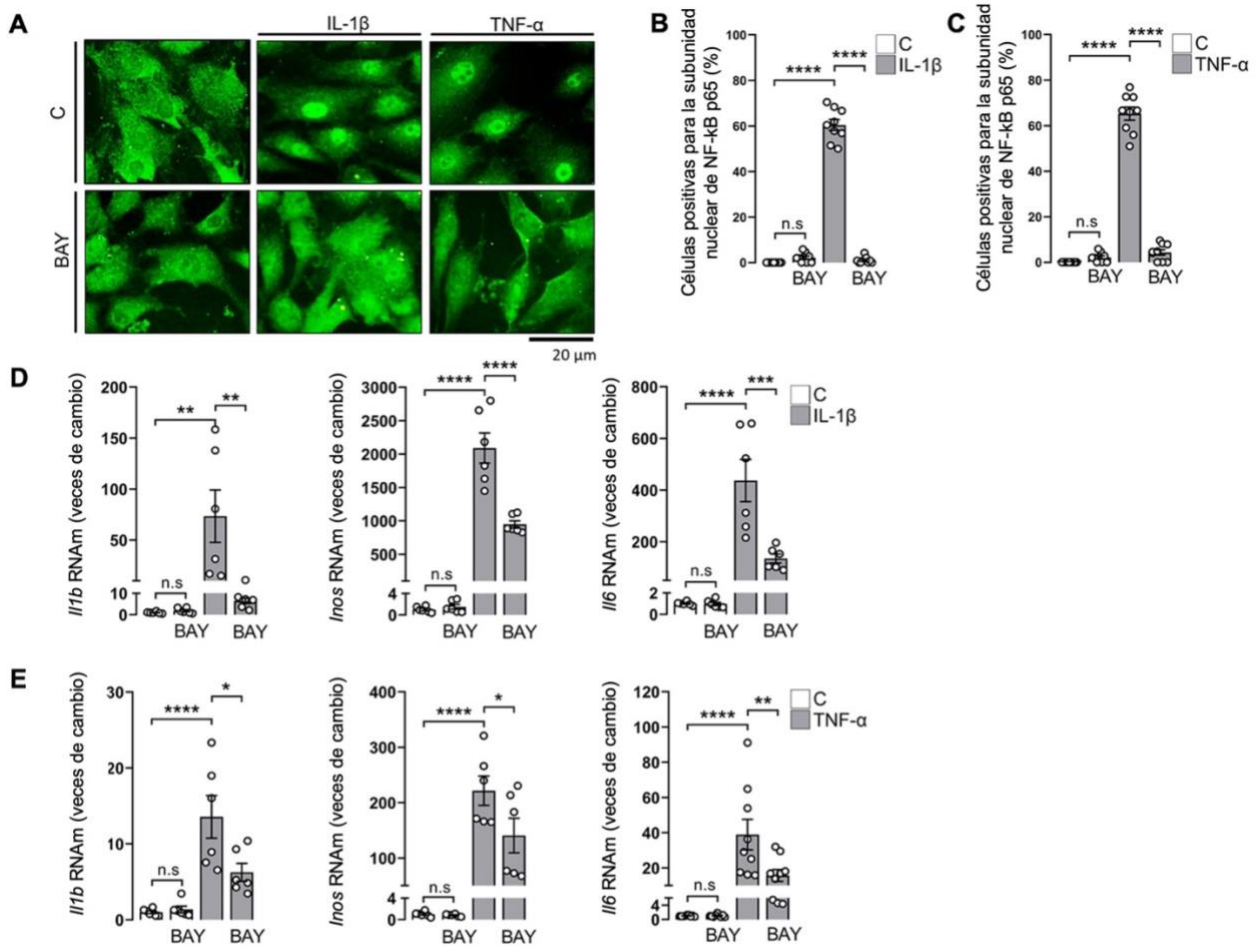


**Figura 12.** La PRL no modifica la expresión de los receptores de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los fibroblastos sinoviales de ratones macho. Cuantificación mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) de la expresión de los genes que codifican IL-1R1 (*Il1r1*), TNFR1 (*Tnfr1*) y TNFR2 (*Tnfr2*) en los FS incubados o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (**A**) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (**B**) en ausencia o presencia de PRL (2.3  $\mu$ g/mL). Los niveles de ARNm se normalizaron al gen constitutivo (*Hprt*) y se expresaron en relación con el control no tratado (C). Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n= 7-9). n.s.: no significativo, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

## **7.6 BAY-11-7885 (BAY) inhibe la translocación nuclear de NF-κB inducida por IL-1β y TNF-α en fibroblastos sinoviales de ratones macho.**

Se ha reportado que la IL-1β y TNF-α activan las vías de señalización de NF-κB (61) y MAPK (62) en los FS. En este estudio, nos enfocamos en evaluar la translocación al núcleo de NF-κB por dichas citocinas dado que existen evidencias de que la PRL puede disminuir la activación NF-κB en un modelo murino inflamatorio de degeneración de disco intervertebral (114).

Inicialmente, corroboramos la influencia de la translocación/activación de NF-κB en los efectos proinflamatorios de la IL-1β y del TNF-α en los FS a través de inhibir al NF-κB mediante su bloqueo farmacológico con BAY 11-7085 (BAY). Encontramos que la IL-1β y el TNF-α promovieron la translocación nuclear de NF-κB, y que el tratamiento con BAY 11-7085 redujo dicha translocación (Figura 13A, B y C). Consistentemente, encontramos que el tratamiento de los FS con BAY disminuyó el efecto de la IL-1β y del TNF-α sobre la expresión de *Il1b*, *Inos* e *Il6* (Figura 13D y 13E). Los resultados indican que la IL-1β y el TNF-α activan la vía de NF-κB en los FS y que dicha vía media, al menos en parte, sus acciones proinflamatorias en este tipo celular. Procedimos entonces a investigar si la PRL modifica la activación de NF-κB en respuesta a la IL-1β y al TNF-α y si esta alteración es consistente con el efecto diferencial de la hormona frente a dichas citocinas.

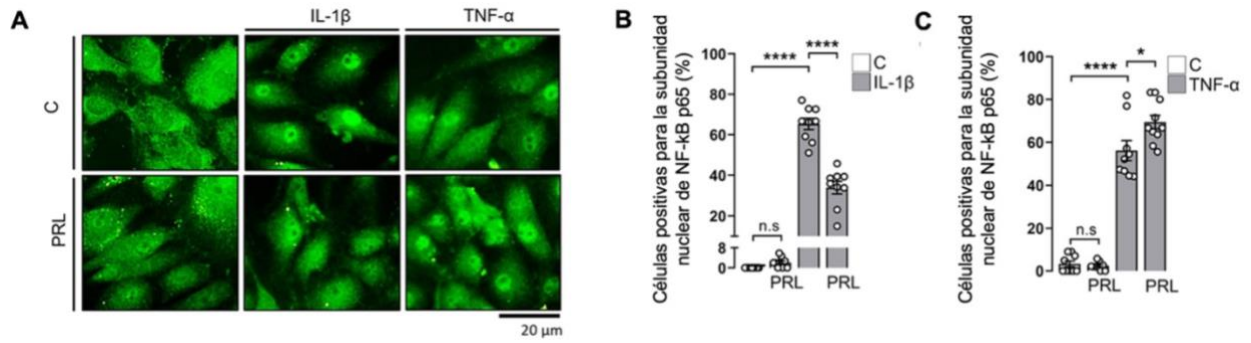


**Figura 13.** BAY-11-7885 (BAY) inhibe la traslocación/activación NF-κB inducida por IL-1β y TNF-α en fibroblastos sinoviales de ratones macho. Detección por inmunofluorescencia de NF-κB (p65) en fibroblastos sinoviales cultivados en ausencia (control, C) o presencia de IL-1β (1 ng/mL) o TNF-α (10 ng/mL) con o sin BAY (10 μM) (A). Cuantificación de núcleos positivos para NF-κB en FS tratados con IL-1β (B) o TNF-α (C) en relación con C. Barra de calibración = 20 μm. Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de los genes que codifican IL-1β (Il1b), iNOS (Inos) e IL-6 (Il6) en FS incubados o no con IL-1β (1 ng/mL) (D) o TNF-α (10 ng/mL) (E) en ausencia o presencia de BAY (10 μM). Los niveles de ARNm se normalizaron al gen constitutivo (Hprt) y se expresaron en relación con el control no tratado (C). Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias ± SEM, (n= 6-9). n.s: no significativo, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### **7.7 La PRL inhibe o estimula la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$ o TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.**

De manera consistente con los resultados previos, observamos que la PRL ejerce una acción diferencial sobre la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B que depende del tipo de citocina proinflamatoria (IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ ). La PRL redujo la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en respuesta a la IL-1 $\beta$  (Figura 14A y 14B). En contraste, la PRL aumentó la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en respuesta al TNF- $\alpha$ , (Figura 14A y 14C). El tratamiento únicamente con PRL no alteró la localización celular de NF- $\kappa$ B en ausencia de dichas citocinas que, como se esperaba, fue esencialmente citoplasmática.

Procedimos entonces a investigar el mecanismo mediante el cual la PRL puede antagonizar o inducir la activación/translocación de NF- $\kappa$ B inducida por la IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Se ha reportado que la PRL tiene la capacidad de interferir con la unión de NF- $\kappa$ B a regiones promotoras de genes específicos, como el promotor del factor regulador del interferón-1 y el promotor de la timidina quinasa que contiene elementos NF- $\kappa$ B multimerizados (115). También se ha reportado (114) que la PRL puede estimular la estabilidad de las proteínas citoplasmáticas I $\kappa$ -Bs, responsables de mantener al NF- $\kappa$ B en el citoplasma.

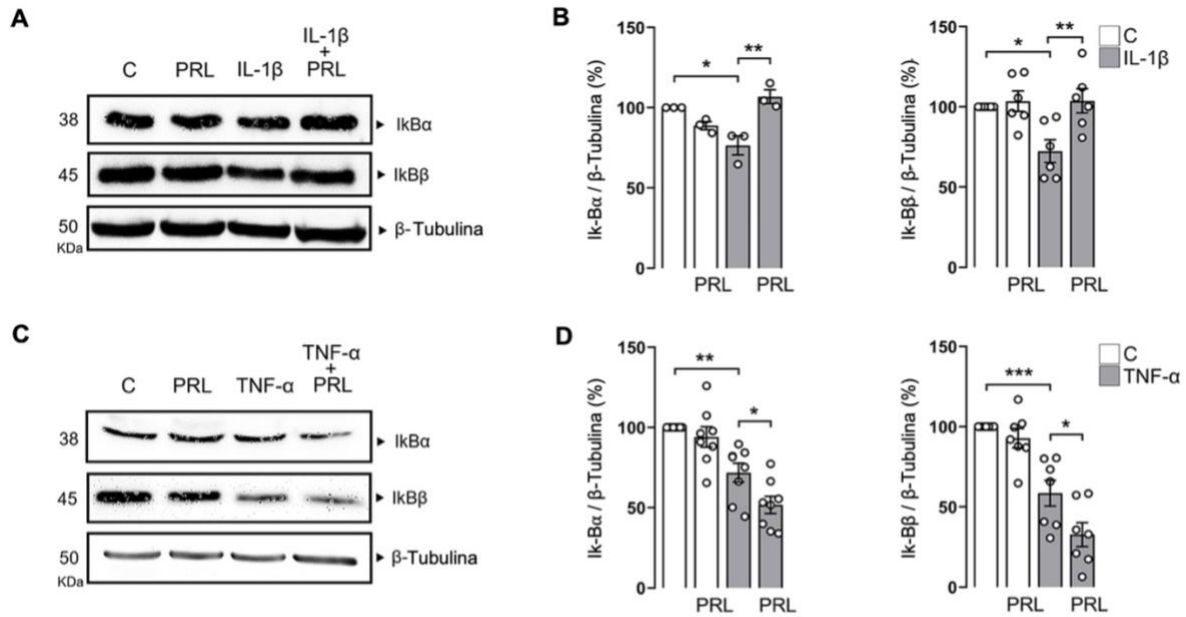


**Figura 14.** La PRL inhibe o estimula la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente. **(A)** Detección por inmunofluorescencia de NF- $\kappa$ B (p65) en fibroblastos sinoviales cultivados en ausencia (control [C]) o presencia de IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) con o sin PRL (2.3  $\mu$ g/mL). Cuantificación de núcleos positivos para NF- $\kappa$ B en FS tratados con IL-1 $\beta$  **(B)** o TNF- $\alpha$  **(C)** en relación con el control (C). Barra de calibración = 20  $\mu$ m. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 3-9$ ). n.s.: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### **7.8 La PRL inhibe o aumenta la degradación de I $\kappa$ -B $\beta$ e I $\kappa$ -B $\alpha$ inducida por IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.**

Como mencionamos anteriormente, NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que bajo condiciones normales se encuentra inactivo en el citoplasma debido a su interacción con una familia de proteínas citoplásmicas, denominadas inhibidores de kappa B (I $\kappa$ -B), que impiden la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Bajo estímulos inflamatorios las I $\kappa$ -B se fosforilan y posteriormente se degradan, lo que permite la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y su unión a secuencias promotoras en el ADN que codifican genes implicados en la producción de factores inflamatorios (54, 80, 116). De manera consistente con los resultados de la Figura 14, la PRL redujo (Figura 15A y 15B) y potenció (Figura 15C y 15D) la concentración, respectivamente por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de I $\kappa$ B, una familia de proteínas responsables de secuestrar a NF- $\kappa$ B en el citoplasma de células no estimuladas. Estos hallazgos indican que la PRL inhibe y estimula la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente, y por lo tanto, que NF- $\kappa$ B media las acciones inflamatorias duales de la PRL en los fibroblastos sinoviales.

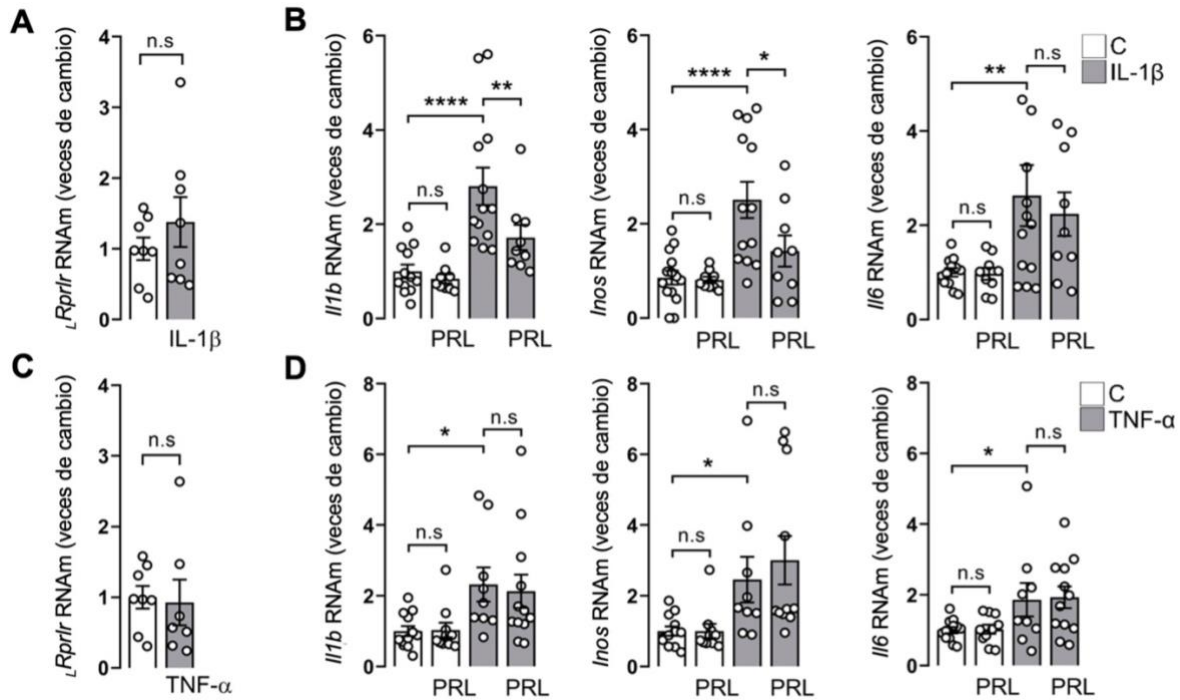




**Figura 15.** La PRL inhibe o aumenta la concentración de *IκBα* e *IκBβ* inducida por *IL-1β* y *TNF-α* en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente. Western blot representativo que muestra las proteínas *IκBα* e *IκBβ* en FS incubados o no (control [C]) con *IL-1β* (1 ng/mL) (A) o *TNF-α* (10 ng/mL) (C) en ausencia o presencia de PRL (2.3 μg/mL). Cuantificación densitométrica de *IκBα* e *IκBβ* normalizadas a β-tubulina después del tratamiento con *IL-1β* (B) o *TNF-α* (D) y expresadas en relación con el control (C). Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias ± SEM (n = 3-9). n.s.: no significativo, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### **7.9 La PRL previene la expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$ en articulaciones de ratones macho.**

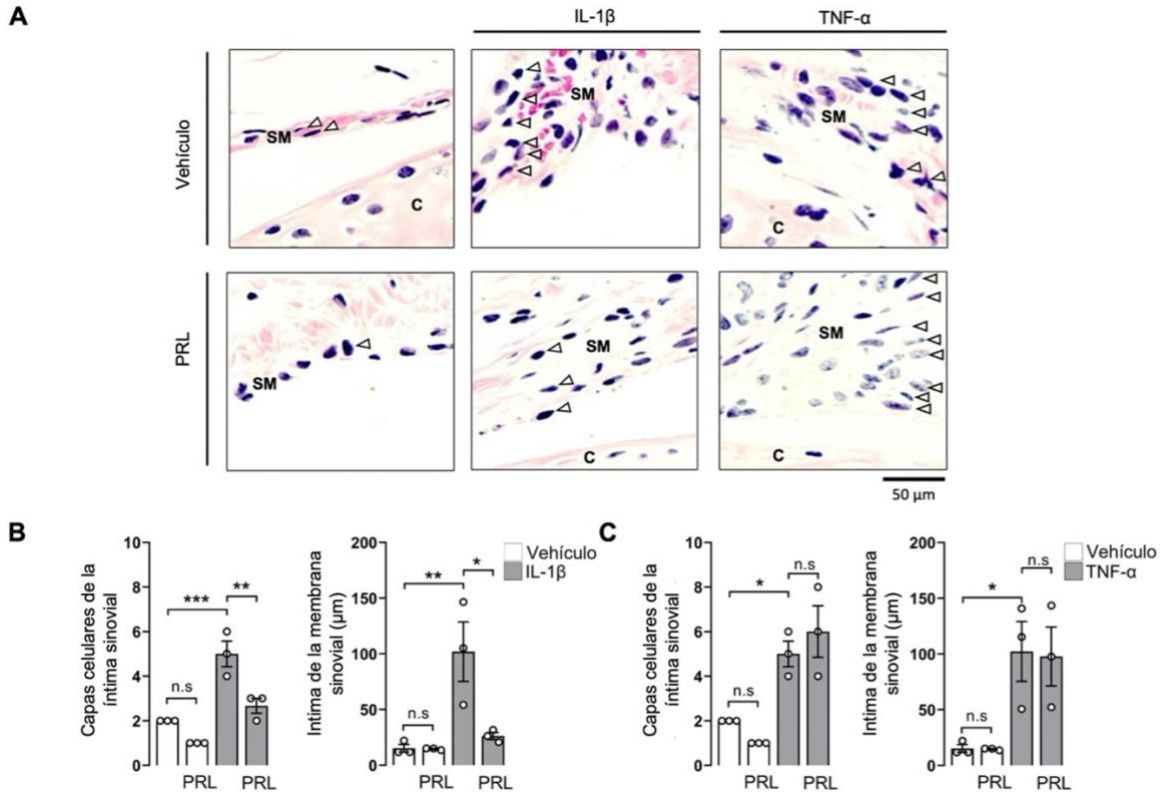
Una vez demostrado que la PRL tiene efectos diferenciales en los FS que dependen del tipo de citocina al cual están expuestos, evaluamos si existe una respuesta diferencial a estas citocinas en un modelo agudo de inflamación articular. Para esto inyectamos en la cavidad articular solución salina como vehículo, cada una de las citocinas de manera independiente con o sin PRL y evaluamos la expresión de algunos mediadores inflamatorios 24 hrs después del tratamiento. No hubo cambios significativos en la expresión de mediadores proinflamatorios en las articulaciones tratadas con PRL en comparación con las articulaciones tratadas con el vehículo (Figura 16). El tratamiento con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  no modificó la expresión del  $\alpha$ RPRL (Figura 16A y 16C) pero sí aumentó la expresión de *Il1b*, *Inos* e *Il6* (Figura 16B y 16D). Además, la PRL inhibió la expresión de *Il1b* e *Inos* inducida por IL-1 $\beta$ , pero no la de *Il6* (Figura 16B). En contraste, la PRL no modificó la expresión de los 3 mediadores inflamatorios inducida por TNF- $\alpha$  en las articulaciones (Figura 16D).



**Figura 16.** La PRL previene la expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$  en las articulaciones de ratones macho. Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de los genes que codifican el  $\Delta RPR$  ( $\Delta Rprlr$ ), IL-1 $\beta$  ( $Il1b$ ), iNOS ( $Inos$ ) e IL-6 ( $Il6$ ) en las articulaciones inyectadas con vehículo (C, solución salina), IL-1 $\beta$  (80 ng/articulación) (A, B) o TNF- $\alpha$  (300 ng/articulación) (C, D) con o sin PRL (2  $\mu$ g). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración. Los valores de ARNm se normalizaron al gen constitutivo ( $Hprt$ ) y se expresaron en relación con las articulaciones inyectadas con vehículo. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 8-13$ ). n.s.: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de LSD Fisher).

### **7.10 La PRL previene la hiperplasia sinovial inducida por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$ en articulaciones de ratones macho.**

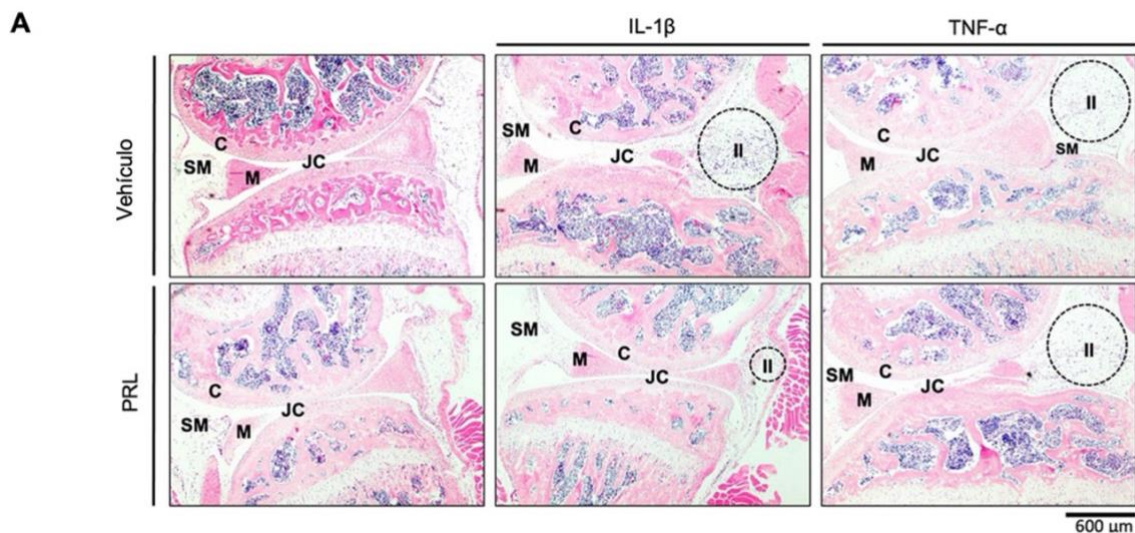
Las articulaciones inyectadas con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  mostraron un nivel leve de hiperplasia sinovial (Figura 17). La hiperplasia sinovial se evaluó contando el número de capas celulares y el grosor (en micras) del revestimiento íntimo de la membrana sinovial. Se observó una membrana sinovial normal con una íntima de 1 a 2 células en las articulaciones inyectadas con vehículo o PRL. La inyección intraarticular de IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  aumentó la íntima a 4-6 capas, mientras que el tratamiento conjunto con PRL previno dicha hiperplasia inducida por IL-1 $\beta$  (Figura 17A y 17B) (número de capas celulares y grosor), pero no ocurrió en respuesta a TNF- $\alpha$  (Figura 17A y 17C).



**Figura 17.** La PRL previene la hiperplasia sinovial inducida por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$  en articulaciones de ratones macho. Micrografías representativas de capas celulares que conforman la íntima sinovial de ratones inyectados en la articulación con vehículo (solución salina), IL-1 $\beta$  (80 ng/articulación) o TNF- $\alpha$  (300 ng/articulación) con o sin PRL (2  $\mu$ g). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la inyección intrarticular. **A.** Secciones de la articulación teñidas con hematoxilina y eosina. Capas celulares de la íntima (punta de flecha). C, cartílago; SM, membrana sinovial. Barra de calibración = 50  $\mu$ m. El número de capas celulares y el grosor ( $\mu$ m) de la íntima de la membrana sinovial evaluaron la hiperplasia sinovial (**B** y **C**). Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). n.s., no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### 7.11 La IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$ no generan daños en estructuras articulares en un modelo agudo de inflamación *in vivo*.

Secciones histológicas de articulaciones inyectadas con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  se tiñeron con hematoxilina y eosina para evidenciar el daño en estructuras articulares como cartílago, hueso y membrana sinovial. Las micrografías no mostraron daño articular aparente, sin embargo, se evidenció un aumento en los infiltrados inmunes en las articulaciones inyectadas con IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ . Este aumento se previno con el tratamiento de PRL frente a la IL-1 $\beta$ , pero no con TNF- $\alpha$  (Figura 18).

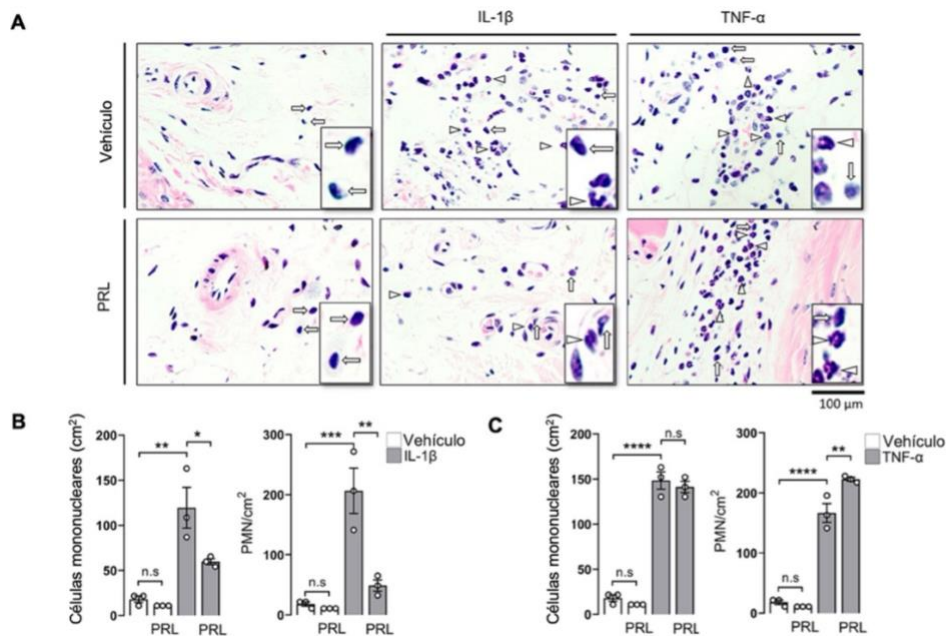


**Figura 18.** La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  no generan daños en estructuras articulares pero si promueven su infiltración leucocitaria en el modelo agudo de inflamación *in vivo*. **(A)** Secciones histológicas representativas de las articulaciones de la rodilla de ratones inyectados en la articulación con vehículo (solución salina), IL-1 $\beta$  (80 ng/articulación) o TNF- $\alpha$  (300 ng/articulación) con o sin PRL (2  $\mu$ g). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la inyección intrarticular. Las secciones de la articulación fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Las líneas circulares discontinuas resaltan áreas con infiltración de células inmunitarias. Barra de calibración = 600  $\mu$ m. C, cartílago; II, infiltrados inflamatorios; JC, cavidad articular; M, menisco; SM, membrana sinovial.



## 7.12 La PRL previene la infiltración de células inmunitarias en respuesta a IL-1 $\beta$ , pero no frente a TNF- $\alpha$ .

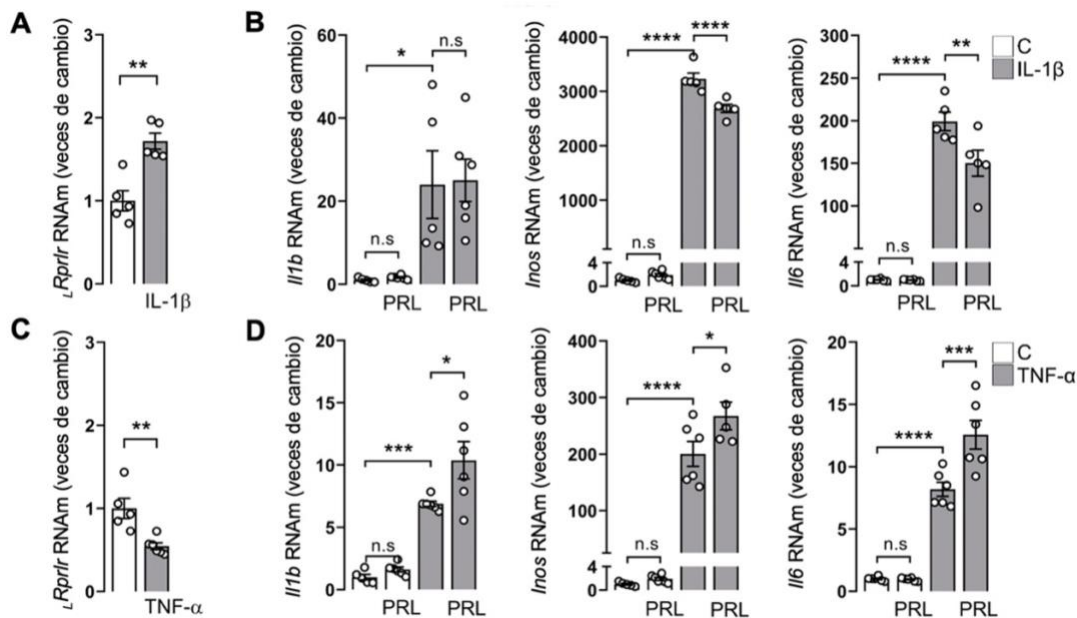
La inyección intraarticular de IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  se asoció con un aumento en la infiltración sinovial de células mononucleares y polimorfonucleares (Figura 19). El tratamiento conjunto con PRL previno de manera efectiva el aumento inducido por IL-1 $\beta$  en la infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares (Figura 19A y 19B). En ratones inyectados con TNF- $\alpha$  y PRL, la infiltración de células mononucleares fue similar a la observada solamente con TNF- $\alpha$  (Figura 19A y 19C). Sin embargo, el aumento inducido por TNF- $\alpha$  en la infiltración de células polimorfonucleares fue significativamente mayor por efecto de la PRL (Figura 19C).



**Figura 19.** La PRL previene la infiltración de células inmunitarias en respuesta a IL-1 $\beta$ , pero no a TNF- $\alpha$ . **(A)** Micrografías representativas de áreas con infiltración de células mononucleares (flecha) y células polimorfonucleares (PMN, cabezas de flecha). Barra de calibración = 100  $\mu$ m. **(B)** Número de células inmunitarias infiltradas por área sinovial de ratones inyectados en la articulación con vehículo o IL-1 $\beta$  (80 ng/articulación) con o sin PRL. **(C)** Número de células inmunitarias infiltradas por área sinovial de ratones inyectados en la articulación con vehículo o TNF- $\alpha$  (300 ng/articulación) con o sin PRL. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración intraarticular. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). n.s., no significativo, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).

### 7.13 La acción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ también ocurre en ratones hembra sobre fibroblastos sinoviales *in vitro*.

Dada la preponderancia de las hembras en la artritis reumatoide, analizamos si las acciones duales de PRL sobre los efectos inflamatorios de las 2 citocinas también se producían en ratones hembra. Los resultados obtenidos en cultivos primarios de FS aislados de hembras en diestro (Figura 20) fueron esencialmente similares a los observados en machos. La IL-1 $\beta$  aumentó y el TNF- $\alpha$  disminuyó la expresión de ARN mensajero del  $\alpha$ LRPRL en fibroblastos sinoviales de ratones hembra en cultivo (Figura 20A y 20C). De manera similar, la PRL redujo la expresión inducida por IL-1 $\beta$  de *Inos* e *Il6*, pero no la de *Il1b* (Figura 20B), y estimuló la expresión inducida por TNF $\alpha$  de los 3 mediadores inflamatorios (*Ilb*, *Inos* e *Il6*) (Figura 20D).

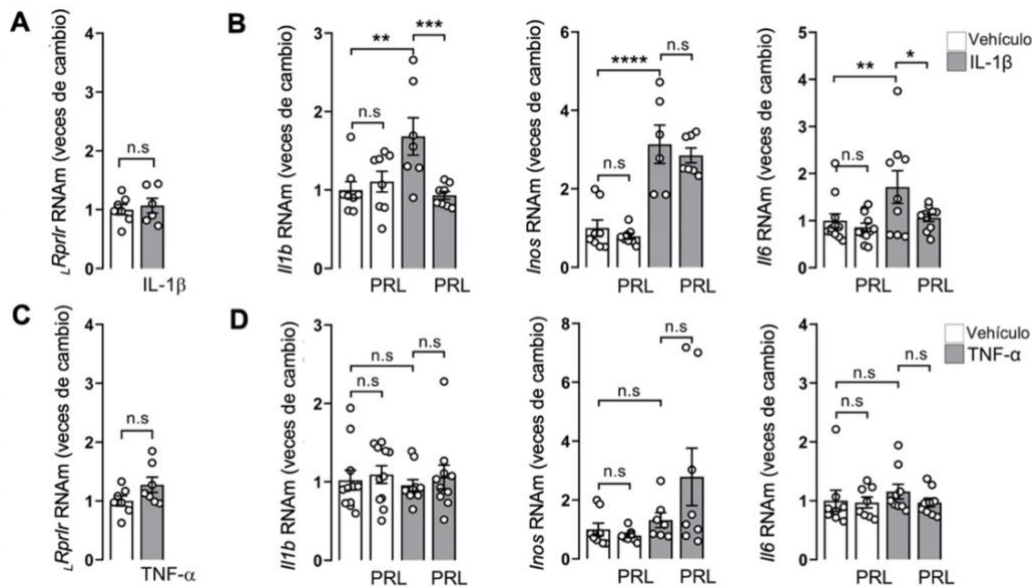


**Figura 20.** La interacción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  también ocurre en ratones hembra sobre fibroblastos sinoviales *in vitro*. La cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de genes que codifican para  $\alpha$ LRPRL (*Lrprlr*), IL-1 $\beta$  (*Il1b*), iNOS (*Inos*) e IL-6 (*Il6*) en fibroblasto sinoviales proveniente de ratones hembra incubados o no con IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (A, B) o TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (C, D) en ausencia o presencia de PRL (2.3  $\mu$ g/mL). Los niveles de ARN mensajero se normalizaron al gen constitutivo (*Hprt*) y se expresaron en relación con el control no tratado (C) después de 24 horas. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 5-6$ ). ns, no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de Tukey).



### 7.14 La acción diferencial de PRL sobre los efectos articulares de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ también ocurre en ratones hembra *in vivo*.

En la condición *in vivo*, y al igual que en los ratones macho, la inyección de IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en la articulación de la rodilla de ratones hembra no modificó los niveles de expresión del  $\downarrow$ RPRL (Figura 21A y 21C). La IL-1 $\beta$  aumentó la expresión de *Ilb*, *Inos* e *Il6* y la PRL inhibió la expresión inducida por IL-1 $\beta$  de *Il1b* e *Il6* pero no sobre *Inos* (Figura 21B). Sin embargo, en contraste con los machos, la inyección de TNF- $\alpha$  en la articulación de la rodilla de las hembras no aumentó la expresión de mediadores proinflamatorios y el cotratamiento de TNF- $\alpha$  y PRL no tuvo efecto (Figura 21D). Estos hallazgos apoyan el que PRL ejerce acciones distintas sobre la respuesta inflamatoria de los tejidos articulares tanto en hembras como en machos.



**Figura 21.** La interacción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  también ocurre en ratones hembra *in vivo*. Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de genes que codifican para  $\downarrow$ RPRLR ( $\downarrow$ Rprlr), IL-1 $\beta$  (*Il1b*), iNOS (*Inos*) e IL-6 (*Il6*) en articulaciones inyectadas con vehículo (solución salina), IL-1 $\beta$  (80 ng/articulación) (A y B), o TNF- $\alpha$  (300 ng/articulación) (C y D) con o sin PRL (2  $\mu$ g). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración. Los valores de ARNm se normalizaron al gen constitutivo (*Hprt*) y se expresaron en relación con las articulaciones inyectadas con vehículo. Se muestran los valores individuales con círculos abiertos. Los valores son medias  $\pm$  SEM ( $n = 8-12$ ). n.s., no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $< 0.0001$  (ANOVA de una vía, con una prueba pos hoc de LSD Fisher).

## 8. Discusión

La relación entre la AR y la PRL se ha estudiado durante mucho tiempo, debido a la mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres que en hombres (117), las propiedades promotoras de la respuesta inmune de la PRL (92) y la expresión de la PRL y de su receptor en el tejido sinovial de pacientes con AR (118). Sin embargo, la PRL tiene efectos tanto estimuladores como inhibidores de la respuesta inmune (11, 119) y la exposición a la hiperprolactinemia fisiológica (lactancia y estrés) (14, 15, 120) o farmacológica (11) se asocian tanto con un alto como con un bajo riesgo de presentar AR. Además, se han observado asociaciones contradictorias entre los niveles circulantes de PRL y la gravedad de la enfermedad en pacientes con AR (121, 122) y se han reportado efectos de la PRL tanto positivos (8, 9) como negativos (123) en modelos experimentales de AR. Las razones detrás de estas observaciones contradictorias no son claras, pero apuntan hacia interacciones complejas en el entorno inflamatorio (124). En este trabajo mostramos que la PRL ejerce efectos positivos o negativos en cultivos de fibroblastos sinoviales (FS) y en las articulaciones *in vivo* de machos y hembras que dependen de su interacción con citocinas proinflamatorias específicas, el nivel de expresión de su receptor y la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B.

Los FS comprenden dos tercios de los sinoviocitos residentes en la membrana sinovial y son efectores fundamentales para el crecimiento del “pannus”, la inflamación y la destrucción articular en la AR (125). Los FS activados adquieren un fenotipo hiperplásico invasivo y producen diversos mediadores proinflamatorios, moléculas de adhesión, metaloproteasas de matriz y quimiocinas que promueven la destrucción de tejidos articulares y perpetúan la inflamación a través de respuestas autocrinas, redes paracrinas entre células vecinas y el reclutamiento de otras estirpes celulares al sinovio (85). Las citocinas proinflamatorias locales, como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , activan a los FS en la RA (85).

En el presente estudio, mostramos que tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  aumentan, en cultivos primarios de FS, la actividad metabólica y la producción de mediadores proinflamatorios sin aumentar la proliferación o supervivencia celular. De hecho, la

IL-1 $\beta$  redujo 4 veces la proliferación de los FS con respecto al control, mientras que el TNF- $\alpha$  no tuvo efecto. Estas observaciones se relacionan con reportes previos que muestran que la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  no estimulan la proliferación de FS derivados de articulaciones artríticas o normales (126), que ambas citocinas promueven la expresión *in vitro* de mediadores proinflamatorios en los FS (127, 128) y que la IL-1 $\beta$  inhibe la proliferación, pero promueve la actividad secretora de los fibroblastos de la pulpa dental humana (129). Por lo tanto, la producción de mediadores proinflamatorios es una respuesta primaria de los FS en cultivo a la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  que podría utilizarse como modelo para evaluar el efecto inflamatorio de la PRL frente a estas citocinas.

Los FS son blancos celulares de la PRL. Los FS de roedores (9) y humanos (118) expresan el  $\alpha$ RPRL, la principal isoforma del receptor responsable de mediar las acciones de esta hormona (110, 111). Las articulaciones artríticas (9, 118) y los FS incubados con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (9) sobre-expresan al  $\alpha$ PRLR; este receptor aumenta en los FS de pacientes con AR bajo inflamación severa y dicho aumento se asocia con el efecto estimulador de la PRL sobre la expresión de la IL-6 (118), una citocina proinflamatoria, producida mayormente por los FS, que es determinante de la progresión de la AR (130, 131). En contraste, los ratones nulos para el RPRL sometidos a artritis inducida por antígeno muestran mayor inflamación articular y expresión de genes proinflamatorios (9) y el tratamiento con PRL reduce la expresión de los mismos mediadores proinflamatorios en la articulación de ratas bajo el mismo modelo de artritis (8). Además, la PRL inhibe el fenotipo inflamatorio (expresión de *Il1b* e *Il6*) inducido por la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y el interferón- $\gamma$  en cultivos de FS murinos (9). Aquí, confirmamos estas observaciones opuestas al mostrar que la PRL ejerce acciones tanto positivas como negativas sobre la respuesta inflamatoria de los FS que dependen de su interacción con citocinas proinflamatorias específicas.

La PRL inhibió el efecto estimulador de la IL-1 $\beta$  sobre la actividad metabólica, la expresión del ARNm de *Il1b*, *Inos* e *Il6* y la secreción de la IL-6 en FS en cultivo; pero incrementó el efecto estimulador del TNF- $\alpha$  sobre los mismos parámetros.

Las acciones opuestas se observaron en FS tanto de ratones macho como hembra y apoyan el que el entorno inflamatorio determina la resultante final de la acción de la PRL. Los mecanismos responsables son desconocidos, pero podrían involucrar una regulación dual de los niveles del  $\text{LRPRL}$  en respuesta a las dos citocinas y/o acciones dicotómicas de la PRL sobre la expresión de los receptores IL1R1, TNFR1 y TNFR2 que median los efectos proinflamatorios de las citocinas (132, 133). En relación con la primera posibilidad, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  modificaron la expresión del  $\text{LRPRL}$  de manera opuesta. La IL-1 $\beta$  aumentó, mientras que el TNF- $\alpha$  disminuyó los niveles del ARNm y de la proteína del  $\text{LRPRL}$  en los FS. En contraste, la PRL no modificó la expresión de los receptores de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Aunque se considera que el  $\text{LRPRL}$  es la isoforma principal responsable de mediar todas las acciones de la PRL, también es posible que participe en la regulación diferencial de las isoformas cortas del  $\text{RPRL}$ . Al respecto, se tiene evidencia de que los receptores cortos de la PRL pueden silenciar el efecto de la forma larga y mediar algunas acciones de la PRL (111).

Para evaluar si una regulación diferencial del  $\text{LRPRL}$  está asociada con cambios en la señalización activada por la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , determinamos el efecto de la PRL sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B en FS en respuesta a una u otra citocina. El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción determinante de la producción de factores inflamatorios en respuesta a la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (84, 127), y su bloqueo tiene acciones benéficas en el tratamiento de la AR (134). La señalización a través de la vía NF- $\kappa$ B requiere de la fosforilación/degradación de proteínas inhibitoras de la familia I $\kappa$ B, lo que conduce a la migración de NF- $\kappa$ B al núcleo para iniciar la transcripción génica. Confirmamos estas observaciones al mostrar que un inhibidor de la fosforilación de I $\kappa$ B (BAY 11-7085) previene la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y reduce la producción de mediadores proinflamatorios en respuesta tanto a la IL-1 $\beta$  como al TNF- $\alpha$ . La PRL inhibió y estimuló la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B como resultado de la modulación en la concentración de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  en respuesta a IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Estos hallazgos confirmaron la regulación diferencial por parte de la PRL de la respuesta inflamatoria de los FS a la IL-1 $\beta$  y el

TNF- $\alpha$  e indicaron la señalización de NF- $\kappa$ B como mecanismo responsable de estos efectos duales.

Diferentes estudios muestran acciones opuestas de la PRL sobre la vía de NF- $\kappa$ B en procesos inflamatorios. La PRL inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y, con ello, retarda la inflamación que conlleva al deterioro de discos intervertebrales en un modelo de enfermedad discal degenerativa (114). Por otra parte, la PRL provoca una respuesta inflamatoria en peces a través de activar la interacción entre las vías de señalización NF- $\kappa$ B y JAK/STAT (135). Además, en los FS la activación de NF- $\kappa$ B por IL-1 $\beta$  se asocia con la regulación al alza de STAT1 (127) y a la baja de STAT3 (61), y la PRL activa la vía JAK2/STAT3 para inhibir la apoptosis de los condrocitos del cartílago articular en la artritis (8). Queda por investigar si la interacción entre las vías de señalización NF- $\kappa$ B y JAK/STAT contribuye a las acciones duales de la PRL observadas en los FS.

Consistentemente con el papel inflamatorio de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , su inyección individual en articulaciones de rodilla de las patas traseras de ratones sanos indujo una inflamación local (136). Este modelo nos permitió investigar si las acciones duales de la PRL sobre la inflamación articular tienen lugar *in vivo*, ya que permite probar el efecto individual de estas citocinas aislado de los muchos mediadores inflamatorios que operan en la artritis. Contrariamente al efecto observado en los FS en cultivo, la inyección intra-articular de la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$  no alteró la expresión del ARNm del LRPRL en ninguno de los sexos. Esta diferencia puede explicarse a través de la contribución de otros tipos celulares y factores regulatorios ausentes en la condición *in vitro*. Se conoce que la regulación de los receptores de PRL en respuesta a la inflamación es tejido-específica (137); que una combinación de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interferón- $\gamma$ ) aumenta el receptor de PRL en fibroblastos pulmonares en cultivo (138) pero, que en el ratón, la exposición a lipopolisacáridos bacterianos disminuye los receptores de PRL en el pulmón (137).

La expresión de genes proinflamatorios y los cambios histológicos en las articulaciones mostraron que la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  inducen inflamación, después de las 24 horas posteriores a su inyección en la articulación, que es dependiente del

sexo. La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  produjeron una respuesta inflamatoria en los ratones macho, mientras que solo la IL-1 $\beta$  provocó inflamación articular en las hembras. La falta de efecto del TNF- $\alpha$  en las hembras es consistente con reportes que muestran una mayor susceptibilidad de los ratones macho al desafío inmunológico (139), incluida la artritis inflamatoria (140). No obstante, en relación con nuestros hallazgos *in vitro*, el efecto de la PRL difirió entre las dos citocinas en machos y en hembras. La PRL redujo la expresión inducida por IL-1 $\beta$  de *Il1b* e *Inos* en machos y de *Inos* e *Il6* en hembras, no modificó la expresión de genes proinflamatorios en respuesta a TNF- $\alpha$  en machos, y no alteró la falta de acción proinflamatoria de TNF- $\alpha$  en las hembras. Finalmente, las dos citocinas resultaron en una leve hiperplasia sinovial e infiltración de las células inmunológicas en las articulaciones de los ratones macho, la PRL previno los cambios histológicos inflamatorios provocados por IL-1 $\beta$ , pero fue inactiva o aumentó la respuesta inflamatoria frente a TNF- $\alpha$ . Es notable que a pesar de la complejidad del sistema *in vivo*, las acciones inflamatorias duales de la PRL se manifestaron contra las dos citocinas en ambos sexos.

El efecto antiinflamatorio de la PRL contra la IL-1 $\beta$  y su falta de acción proinflamatoria contra TNF- $\alpha$  observados *in vivo* son consistentes con el papel benéfico neto de la PRL observado en modelos murinos con AR (8, 9). Sin embargo, la estimulación *in vivo* por parte de la PRL sobre la infiltración polimorfonuclear inducida por TNF- $\alpha$  también es consistente con informes que muestran que la PRL estimula la extravasación de leucocitos bajo condiciones inflamatorias (141-143) y promueve la adhesión de células inmunológicas al endotelio vascular (144). El desafío radica en entender la contribución relativa de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  u otras citocinas en las reacciones inflamatorias y cuándo y cómo la PRL interactúa con cada una de ellas para influir en la respuesta inflamatoria.

En resumen, nuestro estudio destaca a la IL-1 $\beta$  y al TNF- $\alpha$  como citocinas centrales capaces de determinar la resultante final de la acción de la PRL en la inflamación articular (Figura 22). La IL-1 $\beta$  regula al alza al  $\uparrow$ RPRL en los FS en asociación con el bloqueo por parte de la PRL de la señalización de NF- $\kappa$ B y la expresión de mediadores proinflamatorios. En contraste, el TNF- $\alpha$  regula a la baja la expresión

del  $\downarrow$ RPRL en los FS en asociación con la sobre activación por parte de la PRL de la señalización de NF- $\kappa$ B y el aumento en la producción de factores proinflamatorios como IL1b, Inos e IL6. Dado que la regulación al alza del RPRL resulta en una acción antiinflamatoria, proponemos que el efecto de la PRL vía su receptor es el de inhibir la inflamación de los tejidos articulares. Una propuesta consistente con la observación de que la artritis es más severa en los ratones nulos para el RPRL (9). Además, el hecho de que el efecto proinflamatorio de la PRL se asocie con la regulación a la baja del  $\downarrow$ RPRL implica la participación de mecanismos activados por el TNF- $\alpha$  que son promovidos indirectamente por la PRL. Uno de esos mecanismos podría involucrar la escisión proteolítica de la PRL a vaso inhibina, un fragmento de PRL que estimula el fenotipo inflamatorio de los FS a través de la activación de NF- $\kappa$ B (145). En relación con este mecanismo, las citocinas proinflamatorias, incluido el TNF- $\alpha$ , regulan al alza la producción de metaloproteasas de matriz en la articulación artrítica capaces de cortar a la PRL a vaso inhibina incrementando la concentración de vaso inhibina en la circulación (145).

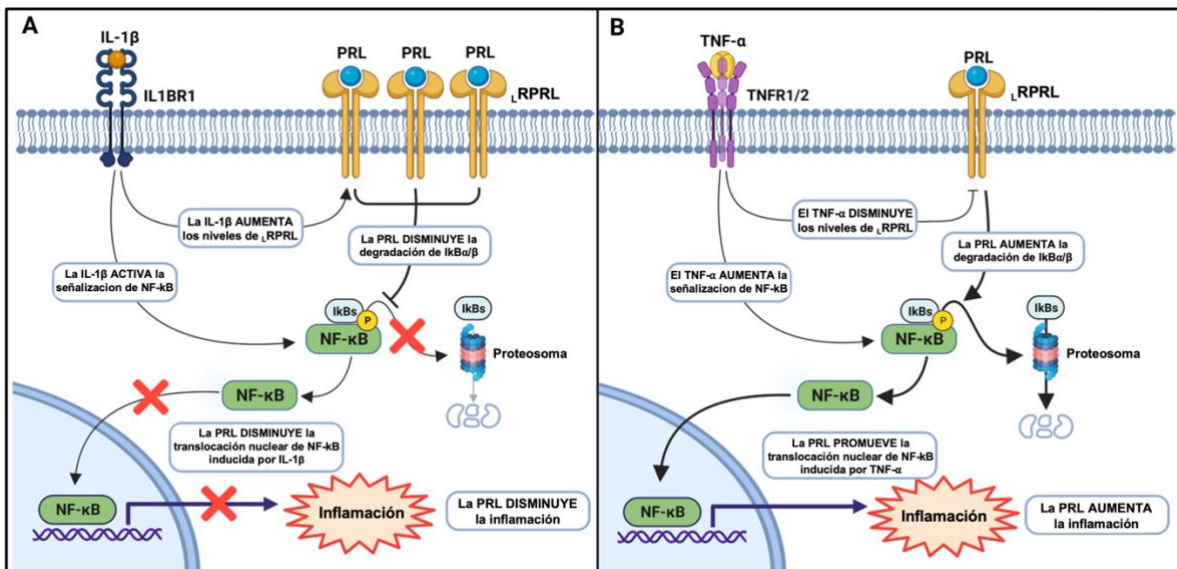
La similitud encontrada entre machos y hembras enfatiza la importancia de los efectos duales de la PRL en la inflamación articular que probablemente se extienden a otras células, mediadores inflamatorios (vaso inhibina) y vías de señalización. Sin embargo, las diferencias entre la condición *in vitro* e *in vivo* resaltan la complejidad de la regulación ejercida sobre el receptor de PRL y la acción de reguladores clave del proceso inflamatorio (TNF- $\alpha$ ).

Aunque nuestros modelos experimentales proporcionan pruebas sólidas de las acciones duales de la PRL en los procesos inflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , presentan limitaciones importantes. Los experimentos *in vitro* permiten controlar las condiciones experimentales con mayor precisión, sin embargo, no consideran interacciones entre diferentes tipos celulares y factores reguladores locales y sistémicos que operan bajo condiciones de artritis. Los experimentos *in vivo* permiten conocer la participación de un entorno inflamatorio más completo que incluye distintos componentes articulares; sin embargo, al ser un modelo agudo, no

representa el estado fisiopatológico presente en una enfermedad tan compleja como la AR. Futuras investigaciones deberán evaluar condiciones presentes en las hembras a lo largo del ciclo estral y bajo diferentes estados reproductivos, con el objetivo final de generar una mejor comprensión del contexto fisiopatológico de la participación de la PRL en la artritis reumatoide y el desarrollo de nuevos tratamientos.



## 9. Resumen gráfico



**Figura 22.** Esquema que ilustra los mecanismos de los efectos duales de la PRL sobre la función inflamatoria de los FS. **(A)** La IL-1 $\beta$  aumenta la expresión del receptor de PRL en su forma larga ( $\text{LRPRL}$ ), lo que conduce a que la PRL inhiba la degradación de los inhibidores de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  y  $\beta$ ), la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la producción de factores inflamatorios. **(B)** TNF- $\alpha$  disminuye la expresión del  $\text{LRPRL}$ , favoreciendo la estimulación por parte de PRL de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ , la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la producción de mediadores inflamatorios. Estos mecanismos pueden trabajar juntos para contribuir al equilibrio de la inflamación articular en la artritis. Este esquema fue creado con Biorender.com.

## **10. Bibliografía**

1. Bultink IE, Vis M, van der Horst-Bruinsma IE, Lems WF. Inflammatory rheumatic disorders and bone. *Current rheumatology reports*. 2012;14(3):224-30.
2. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):1-16.
3. Mendoza-Vázquez G, Rocha-Muñoz AD, de Jesús Guerra-Soto A, Ramírez-Villafaña M, González-Sánchez AG, Gámez-Nava JI, et al. Artritis reumatoide y dislipidemias. *El residente*. 2013;8(1):12-22.
4. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saldenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. 2012;39(3):222-8.
5. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012;51(suppl\_5):v3-v11.
6. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-61.
7. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233(1):233-55.
8. Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG, Perales-Canales SI, Quintanar-Stephano A, Lopez-Barrera F, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3902-13.
9. Ledesma-Colunga MG, Adan N, Ortiz G, Solis-Gutierrez M, Lopez-Barrera F, Martinez de la Escalera G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):1-16.
10. Christodoulou C, Choy E. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental medicine*. 2006;6(1):13-19.

11. Clapp C, Adan N, Ledesma-Colunga MG, Solis-Gutierrez M, Triebel J, Martinez de la Escalera G. The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(15):2929-48.
12. Guthrie KA, Dugowson CE, Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL. Does pregnancy provide vaccine-like protection against rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism.* 2010;62(7):1842-8.
13. Østensen M, Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Seminars in immunopathology.* 2007; 29:185-191.
14. Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(11):3458-67.
15. Brennan P, Silman A. Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* 1994;37(6):808-13.
16. Hampl JS, Papa DJ. Breastfeeding-related onset, flare, and relapse of rheumatoid arthritis. *Nutrition reviews.* 2001;59(8):264-8.
17. Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain, behavior, and immunity.* 1992;6(4):409-17.
18. Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, de la Escalera GM, et al. Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Laboratory Investigation.* 2020:1-12.
19. Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6(3):111-25.
20. Longobardi L, Li T, Tagliaferro L, Temple JD, Willcockson HH, Ye P, et al. Synovial joints: from development to homeostasis. *Current osteoporosis reports.* 2015;13(1):41-51.
21. Adán N, Ledesma-Colunga MG, Reyes-López AL, de la Escalera GM, Clapp C. Arthritis and prolactin: a phylogenetic viewpoint. *General and comparative endocrinology.* 2014;203:132-6.

22. Blanco SB, Solís JR, Iza NB. Artritis Inflammatorias. En Tratado de geriatría para residentes. 2006; (697-704). Editorial IM&C.
23. Van der Horst-Bruinsma I, Lems W, Dijkmans B. A systematic comparison of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clinical & Experimental Rheumatology*. 2009;27(4):S43.
24. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003;108(24):2957-63.
25. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9746):1094-108.
26. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51 Suppl 5:v3-11.
27. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone research*. 2018;6(1):15.
28. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-19.
29. Svendsen AJ, Junker P, Houen G, Kyvik KO, Nielsen C, Skytthe A, et al. Incidence of chronic persistent rheumatoid arthritis and the impact of smoking: a historical twin cohort study. *Arthritis care & research*. 2017;69(5):616-24.
30. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2018;36(2):175-84.
31. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):1-10.
32. Hu Y, Sparks JA, Malspeis S, Costenbader KH, Hu FB, Karlson EW, et al. Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(8):1357-64.

33. Azzi L, Rania S, Vinci R, Spadari F, Croveri F, Scognamiglio C, et al. Periodontal microbioma and rheumatoid arthritis: The role of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(2 Suppl 1):97-103.
34. Jung H, Jung SM, Rim YA, Park N, Nam Y, Lee J, et al. Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PloS one*. 2017;12(11):e0188698.
35. van den Berg WB, van Lent PL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI. Amplifying elements of arthritis and joint destruction. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66 Suppl 3:iii45-8.
36. Farrugia M, Baron B. The role of TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. *Journal of clinical and translational research*. 2016;2(3):84.
37. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis--Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*. 2015;76(2):527-36.
38. Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K. Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis and rheumatism*. 1981;24(6):835-43.
39. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(6):1-10.
40. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(11):1781-90.
41. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):1-12.
42. Huber LC, Distler O, Tarnier I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006;45(6):669-75.

43. Mengshol JA, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(1):13-20.
44. Kontny E, Grabowska A, Kowalczewski J, Kurowska M, Janicka I, Marcinkiewicz J, et al. Taurine chloramine inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1999;42(12):2552-60.
45. Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis research*. 2000;2(5):356-60.
46. Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P. The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(2):456-63.
47. Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2003;5(4):1-6.
48. López-Benítez C, Pláceres U, Alonzo E, Rodríguez B. Papel patogénico de los fibroblastos en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2001;24(1):42-6.
49. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(6):429-42.
50. Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev*. 2008;223:7-19.
51. Feldmann M, Brennan F, Foxwell B, Maini R. The role of TNF- $\alpha$  and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun*. 2001;3:188-99.
52. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *TNF pathophysiology*. 11: Karger Publishers; 2010. p. 180-210.
53. Davis JM, Matteson EL. Cytokine biomarkers and the promise of personalized therapy in rheumatoid arthritis. *Reumatología clínica*. 2009;5(4):143-6.

54. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:561459.
55. Piccioli P, Rubartelli A, editors. The secretion of IL-1 $\beta$  and options for release. *Seminars in immunology*; 2013; 25(6):425-429.
56. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 1993;52(12):870-5.
57. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and cartilage.* 2012;20(12):1484-99.
58. Aigner T, McKenna L, Zien A, Fan Z, Gebhard PM, Zimmer R. Gene expression profiling of serum-and interleukin-1 $\beta$ -stimulated primary human adult articular chondrocytes—A molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor. *Cytokine.* 2005;31(3):227-40.
59. Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Vitamins & Hormones.* 2006;74:229-54.
60. Sadouk MB, Pelletier J-P, Tardif G, Kiansa K, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1995;73(3):347-355.
61. Lou L, Liu Y, Zhou J, Wei Y, Deng J, Dong B, et al. Chlorogenic acid and luteolin synergistically inhibit the proliferation of interleukin-1 $\beta$ -induced fibroblast-like synoviocytes through regulating the activation of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT-signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015;37(6):499-507.
62. Zhu L, Zhu L. Sophocarpine suppress inflammatory response in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw.* 2017;28(3):120-6.

63. Roman-Blas J, Jimenez S. NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006;14(9):839-48.
64. Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(1):1-13.
65. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):184-95.
66. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews immunology*. 2003;3(9):745-56.
67. Webb GR, Westacott CI, Elson CJ. Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*. 1998;6(3):167-76.
68. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM. IKK biology. *Immunological reviews*. 2012;246(1):239-53.
69. Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.
70. Prescott JA, Cook SJ. Targeting IKK $\beta$  in cancer: challenges and opportunities for the therapeutic utilisation of IKK $\beta$  inhibitors. *Cells*. 2018;7(9):115.
71. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development*. 1995;9(22):2723-35.
72. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Wu Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science*. 1997;278(5339):860-6.
73. Spencer E, Jiang J, Chen ZJ. Signal-induced ubiquitination of I $\kappa$ B $\alpha$  by the F-box protein Slimb/ $\beta$ -TrCP. *Genes & development*. 1999;13(3):284-94.
74. Makarov SS. NF- $\kappa$ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis research & therapy*. 2001;3(4):1-7.



75. Gilston V, Jones HW, Soo CC, Coumbe A, Blades S, Kaltschmidt C, et al. NF- $\kappa$ B activation in human knee-joint synovial tissue during the early stage of joint inflammation. *Biochem Soc Trans*. 1997; 25(3):518S.
76. Handel ML, Mcmorrow LB, Gravallesse EM. Nuclear factor- $\kappa$ B in rheumatoid synovium. Localization of P50 and P65. *Arthritis & Rheumatism*. 1995;38(12):1762-70.
77. Asahara H, Asanuma M, Ogawa N, Nishibayashi S, Inoue H. High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochemistry and molecular biology international*. 1995;37(5):827-32.
78. Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. The regulation and roles of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors during lymphocyte activation. *Current opinion in immunology*. 1998;10(3):353-9.
79. Kuo CT, Leiden JM. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annual review of immunology*. 1999;17(1):149-87.
80. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2(1):1-9.
81. Samimi LN, Farhadi E, Tahmasebi MN, Jamshidi A, Vaziri AS, Mahmoudi M. NF- $\kappa$ B signaling in rheumatoid arthritis with focus on fibroblast-like synoviocytes. *Autoimmunity Highlights*. 2020;11(1):1-10.
82. Matsumura T, Saito Y, Suzuki T, Teramoto A, Ozasa Y, Yamashita T, et al. Phosphorylated platelet-derived growth factor receptor-positive cells with anti-apoptotic properties accumulate in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:241.
83. Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl S. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(1):231-47.
84. Aupperle KR, Bennett BL, Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. NF- $\kappa$ B regulation by I $\kappa$ B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *The Journal of Immunology*. 2001;166(4):2705-11.

85. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013;9(1):24-33.
86. Sakane T, Suzuki N. Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity: Springer*; 2001. p. 161-81.
87. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews*. 2008;29(1):1-41.
88. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1523-631.
89. Manzon LA. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General and comparative endocrinology*. 2002;125(2):291-310.
90. Clevenger CV, Rycyzyn MA, Syed F, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction. *Prolactin: Springer*; 2001. p. 355-79.
91. Kelly P, Binart N, Freemark M, Lucas B, Goffin V, Bouchard B. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochemical Society Transactions*. 2001; 29(2), 48-52.
92. Yu-Lee L-Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research*. 2002;57:435-56.
93. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current opinion in immunology*. 1998;10(3):271-8.
94. Neidhart M, Gay RE, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother*. 1999;53(5-6):218-22.
95. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed*. 2007;78 Suppl 1:255-61.
96. Whyte A, Williams R. Bromocriptine suppresses postpartum exacerbation of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1988;31(7):927-8.
97. Spangelo BL, Hall NR, Ross PC, Goldstein AL. Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A-induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin. *Immunopharmacology*. 1987;14(1):11-20.

98. Jacobi A, Rohde W, Volk H, Dörner T, Burmester G, Hiepe F. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60(3):242-7.
99. Zhao J, Ouyang Q, Hu Z, Huang Q, Wu J, Wang R, et al. A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts. *Biomed Rep*. 2016;5(2):171-5.
100. Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*. 2017;41(6):919-25.
101. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2415-20.
102. Chazotte B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(1):pdb prot5557.
103. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
104. Trask OJ, Jr. Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2012.
105. Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S, et al. An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*. 2001;50(2):65-72.
106. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *The Journal of Immunology*. 2005;174(2):864-70.
107. Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology*. 1989;66(2):196-200.

108. Nadiv O, Beer Y, Goldberg M, Agar G, Loos M, Katz Y. Decreased induction of IL-1 $\beta$  in fibroblast-like synoviocytes: a possible regulatory mechanism maintaining joint homeostasis. *Mol Immunol*. 2007;44(12):3147-54.
109. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T, et al. The role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology*. 2002;41(3):329-37.
110. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*. 1998;19(3):225-68.
111. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010;21(6):362-8.
112. Friedman W. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Experimental neurology*. 2001;168(1):23-31.
113. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1 $\beta$  augments TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009;29(5):273-84.
114. Wu X, Liu Y, Guo X, Zhou W, Wang L, Shi J, et al. Prolactin inhibits the progression of intervertebral disc degeneration through inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway in rats. *Cell death & disease*. 2018;9(2):1-11.
115. Luo G, Yu-Lee L. Stat5b inhibits NF $\kappa$ B-mediated signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2000;14(1):114-23.
116. Barchowsky A, Frlata D, Vincenti MP. Integration of the NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. 2000;12(10):1469-79.
117. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2002;4:1-8.
118. Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell

functions in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(9):1890-900.

119. Pereira Suarez AL, Lopez-Rincon G, Martinez Neri PA, Estrada-Chavez C. Prolactin in inflammatory response. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:243-64.

120. Cutolo M, Straub RH. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation*. 2007;13(5-6):277-82.

121. Orbach H, ZANDMAN-GODDARD G, Amital H, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1109(1):385-400.

122. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2007;6(8):537-42.

123. Neidhart M, Flückiger E. Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology*. 1992;77(3):449.

124. Clapp C, Ortiz G, García-Rodrigo JF, Ledesma-Colunga MG, Martínez-Díaz OF, Adán N, et al. Dual Roles of Prolactin and Vasoinhibin in Inflammatory Arthritis. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:905756.

125. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical immunology*. 2005;115(2):118-28.

126. Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(4):1267-76.

127. Yang J, Wang J, Liang X, Zhao H, Lu J, Ma Q, et al. IL-1 $\beta$  increases the expression of inflammatory factors in synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes via activation of the NF- $\kappa$ B-mediated ERK-STAT1 signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2019;20(6):4993-5001.

128. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min K-H, Park SH, et al. TNF $\alpha$  induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(4):928-938.
129. Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 $\beta$  on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Journal of Endodontics*. 1998;24(6):409-13.
130. Gurne P, Zuraw B, Vaughan J, Carson D, Lotz M. Synovium as a source of interleukin-6 in vitro. *Jf Clin Invest*. 1989;83:585-92.
131. Choi HM, Oh DH, Bang JS, Yang H-I, Yoo MC, Kim KS. Differential effect of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on the production of IL-6, IL-8 and PGE 2 in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatology international*. 2010;30:1025-33.
132. Zhang H, Xiao W. TNFR1 and TNFR2 differentially mediate TNF- $\alpha$ -induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biology International*. 2017;41(4):415-22.
133. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*. 2018;281(1):8-27.
134. Li G, Xia Z, Liu Y, Meng F, Wu X, Fang Y, et al. SIRT1 inhibits rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte aggressiveness and inflammatory response via suppressing NF- $\kappa$ B pathway. *Bioscience reports*. 2018;38(3):BSR20180541.
135. Olavarría VH, Sepulcre MP, Figueroa JE, Mulero V. Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1 $\beta$  in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *The Journal of Immunology*. 2010;185(7):3873-83.
136. Bolon B, Campagnuolo G, Zhu L, Duryea D, Zack D, Feige U. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  produce distinct, time-dependent patterns of acute arthritis in the rat knee. *Veterinary Pathology*. 2004;41(3):235-43.
137. Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martín E, Schock BC, Kenny TP, et al. Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004;287(4):E750-E7.

138. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, et al. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 2003;544(1-3):171-5.
139. Gahima I, Twizeyimana E, LuckGonzales E, Remonde CG, Jeon SJ, Shin CY. Strain, age, and gender differences in response to lipopolysaccharide (LPS) animal model of sepsis in mice. *Yakhak Hoeji.* 2021;65(1):17-22.
140. Schuh BM, Macáková K, Feješ A, Groß T, Belvončíková P, Janko J, et al. Sex differences in long-term effects of collagen-induced arthritis in middle-aged mice. *Frontiers in Physiology.* 2023;14:1195604.
141. Tangbanluekal L, Robinette C. Prolactin mediates estradiol-induced inflammation in the lateral prostate of Wistar rats. *Endocrinology.* 1993;132(6):2407-16.
142. Olson KK, Townson DH. Prolactin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and the accumulation of monocytes/macrophages during regression of the rat corpus luteum. *Biology of reproduction.* 2000;62(6):1571-8.
143. Meli R, Gualillo O, Raso GM, Di Carlo R. Further evidence for the involvement of prolactin in the inflammatory response. *Life sciences.* 1993;53(6):PL105-PL10.
144. de Oca PM, Macotela Y, Nava G, Lopez-Barrera F, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Laboratory investigation.* 2005;85(5):633-42.
145. Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, García-Rodrigo JF, Adan N, Martínez-Díaz OF, et al. Vasoinhibin is Generated and Promotes Inflammation in Mild Antigen-induced Arthritis. *Endocrinology.* 2022;163(5): bqac036..

## **11. Índice de figuras**

**Figura 1.** Representación gráfica de los componentes de una articulación sinovial sana.

**Figura 2.** Vía de señalización intracelular de la IL-1 $\beta$ .

**Figura 3.** Vía de señalización intracelular del TNF- $\alpha$ .

**Figura 4.** Vía de señalización clásica del NF- $\kappa$ B.

**Figura 5.** Inductores, moléculas efectoras y acciones del NF- $\kappa$ B.

**Figura 6.** Regulación de la secreción de PRL.

**Figura 7.** Vía de señalización de la PRL.

**Figura 8.** La PRL inhibe o estimula el aumento en la actividad metabólica inducida por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.

**Figura 9.** Los efectos duales de la PRL no se asocian con cambios en la supervivencia o proliferación de los fibroblastos sinoviales de ratones macho.

**Figura 10.** La PRL inhibe o estimula la expresión de mediadores proinflamatorios en fibroblastos sinoviales de ratones macho en respuesta a IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , respectivamente.

**Figura 11.** La IL-1 $\beta$  aumenta y el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión del receptor LPRL en fibroblastos sinoviales de ratones macho.

**Figura 12.** La PRL no modifica la expresión de los receptores de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los fibroblastos sinoviales de ratones macho.

**Figura 13.** BAY-11-7885 (BAY) inhibe la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho.

**Figura 14.** La PRL inhibe o estimula la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.



**Figura 15.** La PRL inhibe y aumenta la concentración de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  inducida por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales de ratones macho, respectivamente.

**Figura 16.** La PRL previene la expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$  en articulaciones de ratones macho.

**Figura 17.** La PRL previene la hiperplasia sinovial inducida por IL-1 $\beta$ , pero no por TNF- $\alpha$  en articulaciones de ratones macho.

**Figura 18.** La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  no generan daños en estructuras articulares en un modelo agudo de inflamación *in vivo*.

**Figura 19.** La PRL previene la infiltración de células inmunitarias en respuesta a IL-1 $\beta$ , pero no a TNF- $\alpha$ .

**Figura 20.** La interacción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  también ocurre en ratones hembra sobre fibroblastos sinoviales *in vitro*.

**Figura 21.** La interacción diferencial de PRL con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  también ocurre en ratones hembra *in vivo*.

**Figura 22.** Esquema que ilustra los mecanismos de los efectos duales de la PRL sobre la función inflamatoria de los FS.

## **12. Índice de tablas**

**Tabla 1.** Secuencia de oligonucleótidos

## 13. Anexos

### 13.1 Publicaciones

**Garcia-Rodrigo J.F.**; Ortiz G.; Martinez-Diaz O.F.; Furuzawa-Carballeda J.; Ruiz-Herrera X.; Macias F.; Martinez de la Escalera G.; Clapp C. "Prolactin inhibits or stimulates the inflammatory response of joint tissues in a cytokine-dependent manner." *Endocrinology* 2023, bqad 156. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqad156>. (IF = 4.8). **2023**

Robles J.P.; Zamora M.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Lorena-Perez A.; Bertsch T.; Martínez de la Escalera G.; Triebel J.; "Vasoinhibin apoptotic, inflammatory, and fibrinolytic actions are in a motif different from its antiangiogenic HGR motif." *Endocrinology* 2023, bqad 185. (IF = 4.8). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqad185> **2023**

Vazquez-Carrillo D.I.; Ocampo-Ruiz A.L.; Baez-Meza A.; Ramirez-Hernandez G.; Adán-Castro E.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Dena-Beltrán J.L.; de los Rios E.; Sanchez-Martinez M.K.; Ortiz G.; Martinez de la Escalera G.; Clapp C.; Macotela Y.; "Dopamine D2 receptor antagonist counteracts hyperglycemia and insulin resistance in diet-induced obese male mice." *Plos One*. Under review. (IF = 3.752). **2023**

**Garcia-Rodrigo J.F.**; Ortiz G.; Martinez-Diaz O.F.; Furuzawa-Carballeda J.; Ruiz-Herrera X.; Bertsch T.; Triebel J.; Martinez de la Escalera G.; Clapp C.; "Vasoinhibin Analogs Vi45-51 and CRiVi45-51 Lack the Proinflammatory Properties of Vasoinhibin in Arthritis." In preparation. -

Salazar-Garcia S\*.; **Garcia-Rodrigo J.F.\***; Delgado Buenrostro N.L.; Martinez-Castañon G.A.; España Sánchez B.L.; Irasema Chirino Y.; Gonzalez C.; "Zinc chloride through N-Cadherin upregulation prevents the damage induced by silver nanoparticles in rat cerebellum". *Journal of Nanoparticle Research* 2022, 24:169. <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05541-0> (IF = 2.533) \*Equal Contribution. **2022**

Clapp C.; Ortiz G.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Ledesma-Colunga M.G.; Martinez-Diaz O.F.; Adan N.; Martinez de la Escalera G.; "Dual Roles of Prolactin and Vasoinhibin in Inflammatory Arthritis". *Frontiers in endocrinology* 2022,13:905756. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.905756> (IF = 6.055). **2022**

Ortiz G.; Ledesma-Colunga M.G.; Wu Z.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Adan N.; **2022**  
Martinez-Diaz O.F.; De los Ríos E.A.; López-Barrera F.; Martinez de la  
Escalera G.; Clapp C.; “Vasoinhibin is Generated and Promotes  
Inflammation in Mild Antigen-induced Arthritis”. *Endocrinology* 2022, 169  
(5). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac036> (IF = 4.8).

Salazar-Garcia S.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Martinez-Castañon G.A.; Ruiz-  
Rodriguez V.M.; Portales-Perez D.P.; Gonzalez C.; “Silver nanoparticles  
(AgNPs) and zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>) exposure order determines the toxicity in  
C6 rat glioma cells”. *Journal of nanoparticle research* 2020, 22:253.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-020-04984-7> (IF = 2.533).

Ortiz G.; Ledesma-Colunga M.G.; Wu Z.; **Garcia-Rodrigo J.F.**; Adan N.; **2020**  
Martinez de la Escalera G.; Clapp C.; “Vasoinhibin reduces joint inflammation  
and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-  
induced arthritis”. *Laboratory Investigation* 2020, 100:1068-1079.  
<https://doi.org/10.1038/s41374-020-0432-5> (IF = 5.662).

## 13.2 Congresos

### Presentaciones Orales

- Prolactin Exerts Anti- and Pro-inflammatory Actions in Joint Tissues That Are Cytokine-Dependent. **ENDO 2023**. Chicago, Illinois, USA. **2023**
- Prolactin inhibits and stimulates the inflammatory response of joint tissues in a cytokine dependent manner. **XXV Congreso Nacional de Inmunología**. Queretaro, MX. **2023**

### Presentaciones representativas de posters

- Prolactin Exerts Anti- and Pro-inflammatory Actions in Joint Tissues That Are Cytokine-Dependent. **ENDO 2023**. Chicago, Illinois, USA. **2023**
- Prolactin inhibits and stimulates the inflammatory response of joint tissues in a cytokine dependent manner. **XXV Congreso Nacional de Inmunología**. Queretaro, MX. **2023**
- Prolactin Exerts Anti- and Pro-inflammatory Actions in Joint Tissues That Are Cytokine-Dependent. **VII Biennial Meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology. NASCE**. Queretaro, MX. **2023**
- Prolactin exerts dual actions on the inflammatory response of synovial fibroblast. **XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica** . Mérida, Yucatán, MX. **2022**

### **13.3 Artículo de investigación derivado de esta tesis**

# Prolactin Inhibits or Stimulates the Inflammatory Response of Joint Tissues in a Cytokine-dependent Manner

Jose Fernando García-Rodrigo,<sup>1,\*</sup> Georgina Ortiz,<sup>1,2,\*</sup> Oscar Fernando Martínez-Díaz,<sup>1</sup> Janette Furuzawa-Carballeda,<sup>3</sup> Xarubet Ruíz-Herrera,<sup>1</sup> Fernando Macias,<sup>1</sup> María G. Ledesma-Colunga,<sup>1</sup> Gonzalo Martínez de la Escalera,<sup>1</sup> and Carmen Clapp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. 76230, México

<sup>2</sup>División de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac Querétaro, Querétaro, Qro. 76246, México

<sup>3</sup>Departamento de Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Ciudad de México 14080, México

**Correspondence:** Carmen Clapp, PhD, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, México. Email: [clapp@unam.mx](mailto:clapp@unam.mx).

\*Contributed equally to the work.

## Abstract

The close association between rheumatoid arthritis (RA), sex, reproductive state, and stress has long linked prolactin (PRL) to disease progression. PRL has both proinflammatory and anti-inflammatory outcomes in RA, but responsible mechanisms are not understood. Here, we show that PRL modifies in an opposite manner the proinflammatory actions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in mouse synovial fibroblasts in culture. Both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upregulated the metabolic activity and the expression of proinflammatory factors (*Il1b*, *Inos*, and *Il6*) via the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. However, IL-1 $\beta$  increased and TNF- $\alpha$  decreased the levels of the long PRL receptor isoform in association with dual actions of PRL on synovial fibroblast inflammatory response. PRL reduced the proinflammatory effect and activation of NF- $\kappa$ B by IL-1 $\beta$  but increased TNF- $\alpha$ -induced inflammation and NF- $\kappa$ B signaling. The double-faceted role of PRL against the 2 cytokines manifested also in vivo. IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  with or without PRL were injected into the knee joints of healthy mice, and joint inflammation was monitored after 24 hours. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increased the joint expression of proinflammatory factors and the infiltration of immune cells. PRL prevented the actions of IL-1 $\beta$  but was either inactive or further increased the proinflammatory effect of TNF- $\alpha$ . We conclude that PRL exerts opposite actions on joint inflammation in males and females that depend on specific proinflammatory cytokines, the level of the PRL receptor, and the activation of NF- $\kappa$ B signaling. Dual actions of PRL may help balance joint inflammation in RA and provide insights for development of new treatments.

**Key Words:** prolactin receptor, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, synovial fibroblasts, rheumatoid arthritis

**Abbreviations:** EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; FBS, fetal bovine serum; I $\kappa$ B, inhibitors of  $\kappa$ B;  $\downarrow$ PRLR, long form of the prolactin receptor; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PRL, prolactin; PRLR, prolactin receptor; RA, rheumatoid arthritis; RT, room temperature; SFs, synovial fibroblasts.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease that destroys articular cartilage and bone. The female preponderance and apparent negative influence of breastfeeding and stress in RA have long linked the sexually dimorphic, reproductive, stress hormone, prolactin (PRL) to disease progression (1). However, the role of PRL in RA is more complex than anticipated. PRL increases in the circulation of some patients with RA with no association with disease severity (2). Physiological hyperprolactinemia (in lactation and stress) (3–6) and pharmacologically induced hyperprolactinemia or hypoprolactinemia (after dopamine D2 receptor blockers or agonists, respectively) (1) have both positive and negative outcomes in RA. Moreover, PRL worsens (7) and improves (8, 9) joint inflammation in rodent models of RA. Dual actions of PRL could help regulate inflammation in arthritis (10) and have encouraged the search for clarifying mechanisms.

The opposite effects of PRL operate at the cellular level. PRL receptors (PRLRs) are expressed in joint cells, including endothelial cells (11), immune cells (12), and synovial fibroblasts (SFs) (9), where the hormone promotes or inhibits proliferation, survival, and inflammation (1, 9, 12–14). These contrasting actions may depend on the levels of PRL (15), PRLRs (9), and PRL interplay with inflammatory mediators and cytokines (10, 13). High PRL levels appear immunosuppressive (15) but are confounded by PRL produced at the inflamed joint (16). The PRLR is upregulated in arthritic joints and SFs treated with a combination of proinflammatory cytokines (9). Moreover, proinflammatory cytokines stimulate the production of matrix metalloproteases that cleave PRL into the proinflammatory and antiangiogenic PRL fragment, vaso-inhibin (13, 17).

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  stand among the proinflammatory cytokines promoting inflammation, cartilage loss, and bone

destruction in RA (18, 19). Both cytokines are upregulated in the circulation of patients with RA, and inhibitors of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  have been approved for the treatment of RA (20, 21). On the other hand, SFs account for most resident cells in hyperplastic RA synovium and respond to IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and other cytokines, to produce most of the effector molecules perpetuating RA inflammation and joint destruction (22). In this study, we sought to investigate whether the specific interaction of PRL with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  influenced the inflammatory response of cultured SFs and joints in vivo. Our results provide evidence that PRL exerts opposite effects on joint inflammation that are proinflammatory cytokine specific.

## Materials and Methods

### Reagents

Ovine PRL was purchased from the National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA, USA); recombinant human IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); and BAY 11-7085 from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### Animals

Male and female C57BL/6 mice (4-6 weeks old and 8 weeks old for in vitro studies and in vivo studies, respectively) were used. The females were monitored by daily vaginal cytology examination and used at 8:00 to 10:00 AM on diestrus. Mice were maintained under standard laboratory conditions (22 °C, 12 hours/12 hours light/dark cycle, and free access to food and water). They were cared for in accordance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, D.C., USA). The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico approved all animal experiments.

### Cell Culture

SFs were isolated and cultured following our previously reported method (9). The femur/fibula/tibia joints were washed with Hank's balanced salt solution supplemented with gentamicin (Gibco, Grand Island, NY) and amphotericin B (Gibco). All muscles and connective tissues were removed, the joint space opened, and the synovial tissue exposed and incubated in high glucose DMEM culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), 50 U/mL penicillin/50  $\mu$ g/mL streptomycin (Invitrogen), 2 mg/mL collagenase type IV (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and 0.2 mg/mL deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) under agitation (300 rpm) for 3 hours at 37 °C. Tissue was vortexed, filtered through mesh filters (100  $\mu$ m), and centrifuged (1500 rpm for 10 minutes). The cellular pellet was resuspended in 20% FBS-DMEM supplemented with 100  $\mu$ g/mL normocin (Sigma-Aldrich) and cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to confluency. Experiments were performed in passage 3. Unless other conditions indicated, the following standard procedure was used: SFs were seeded at 10<sup>6</sup> cells/well in 6-well plates with 1 mL 1% FBS-DMEM for 16 hours and subsequently incubated in the absence (control) or presence of IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) alone or in

combination with PRL (2.3  $\mu$ g/mL) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M) for 24 hours.

### MTT Metabolic Assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) metabolic assay was performed as previously described (23). SFs were seeded at 3.5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well in 96-well plates and treated with different concentrations of PRL, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  or with a single concentration of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  together with different concentrations of PRL. Incubations were for 72 hours in 100  $\mu$ L of 1% FBS-DMEM. Ten microliters of the MTT stock solution were then added to each well and incubated for 4 hours at 37 °C. The medium was removed and 100  $\mu$ L of solubilizing buffer (10% SDS dissolved in 0.01 N HCl) was added to each well and incubated overnight. Absorbance was measured at 570 nm using an ELISA plate reader and final values were expressed as fold-change over untreated control samples.

### Proliferation Assay

SFs were seeded at 10<sup>3</sup> cells/well in 96-well plates and incubated with 10  $\mu$ M of the thymidine analogue 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Sigma-Aldrich) in the absence (control) or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL), IL-1 $\beta$  (1 ng/mL), or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 72 hours in 100  $\mu$ L of 1% FBS-DMEM. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 1 hour. DNA synthesis was quantified by the DNA incorporation of EdU labeled by the click reaction with fluorescent Azide Fluor 545 (Sigma-Aldrich) as previously reported (24). Images were obtained in a fluorescence-inverted microscope (Olympus IX51) and quantified using ImageJ 1.X software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The number of EdU-positive cells was normalized against total cells stained for DNA with bisBenzimide Hoescht 33342 trihydrochloride (Sigma-Aldrich).

### Apoptosis ELISA

Apoptosis was evaluated using the cell death detection ELISA kit (Catalog # 11544675001, RRID: AB\_3068343 Roche, Basel, Switzerland). SFs were seeded at 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells on 24-well plates in the absence (control) or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL), IL-1 $\beta$  (1 ng/mL), or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 24 hours in 100  $\mu$ L of 1% FBS-DMEM. Cells were trypsinized, centrifuged for 5 minutes at 1500 rpm, resuspended with 250  $\mu$ L of incubation buffer to 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells, incubated at room temperature (RT) for 30 minutes and then subjected to centrifugation at 20 000g for 10 minutes. The supernatant was collected and diluted in a 1:5 ratio with incubation buffer. The assay was conducted following the manufacturer's instructions. Absorbance of histone associated DNA fragments was measured at 405 nm using an ELISA plate reader.

### Quantitative Real-time-PCR

The procedure previously reported was used (9). Briefly, total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen), reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and diluted (10 ng/ $\mu$ L) in RNase-free water. PCR products were obtained and quantified using Maxima SYBR Green



qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a final reaction volume of 10  $\mu$ L containing 5  $\mu$ L cDNA template and 0.5  $\mu$ M of forward and reverse primers for the mouse genes: *Hprt* (forward 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' and reverse 5'-GTTGAGAGATCATCTCCACC-3'), *Prlr* (forward 5'-ACACGCGCAGATCTCCTTACC A- 3' and reverse 5'-CCCCTTCTTGACAGCCACTT-3'); *Il1b*, (forward 5'-GTTGATTCAAGGGGACATTA-3' and reverse 5'-AGCTTCAATGAAAGACCTCA-3'), *Inos* (forward 5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3' and reverse 5'-CATTGAAGTGAAGCGTTTCG-3'), *Il6* (forward 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' and reverse 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'), *Il1r1* (forward 5'- AAATAAAATGCACGGCGACA-3' and reverse 5'- TAACACAA GCCAGGGTCAAT-3'), *Tnfsr1* (forward 5'- TGTCGGAA GAAATGTCCCA-3' and reverse 5'- TCTCAGAAAGAAC CCTGCAT-3'), and *Tnfsr2* (forward 5'-AGATGTGCTGT GCTAAGTGT-3' and reverse 5'-ACACTCGGTTCTGCTG TTTA-3'). Sample amplification included a 10-minute denaturalization step at 95 °C, followed by 35 amplification cycles (10 seconds at 95 °C, 30 seconds at the primer pair-specific annealing temperature, and 30 seconds at 72 °C). The 2- $\Delta\Delta$ CT method was used to calculate the mRNA expression levels and cycle thresholds were normalized to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (*hprt*).

### IL-6 ELISA

Conditioned media were stored at -80 °C until assayed for IL-6 secreted levels using the Mouse IL-6 DuoSet ELISA kit (Catalog # DY406-05, RRID: AB\_3068344, R&D Systems) according to manufacturer instructions.

### Nuclear F- $\kappa$ B Nuclear Translocation

We used the previously reported procedure (25). Briefly, SFs were seeded at  $5 \times 10^4$  cells on glass coverslips and incubated in 24-well plates in the absence (control) or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M) for 30 minutes before adding IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 15 minutes. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed, and incubated with 1% BSA and 5% normal goat serum (Gibco) in 0.05% Triton X-100-PBS for 1 hour at RT, followed by overnight incubation at 4 °C with anti-p65 NF- $\kappa$ B subunit (1:1000, Catalog # Sc-109, RRID: AB\_632039, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Cells were then stained with Alexa Fluor 488 secondary antibodies (1:500, Catalog # Ab150077, RRID: AB\_2630356, Abcam, Cambridge, UK) for 2 hours at RT, mounted with DAPI containing Vectashield (Vector laboratories, CA, USA), and sealed. Images were visualized under fluorescence microscopy and quantified with the ImageJ 1.X software. The number of positive cells for nuclear p65 was normalized against total cells stained with DAPI.

### Western Blot

Western blot evaluated the levels of the PRLR in SFs incubated with different treatments under the standard procedure carried out as previously reported (9). For the Western blot evaluation of inhibitors of  $\kappa$ B (IkBs), SFs were incubated in the absence (control) or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL) for 30 minutes before adding IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)

for 15 minutes. In all cases, SFs were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0.5% Igepal, 0.1% SDS, pH 7.5) with 1/100 (v/v) of a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich). Fifty micrograms of total protein was subjected to reducing SDS/PAGE (12%), blotted, and probed overnight with anti-PRLR (1:500, Catalog # Sc-377098, RRID: AB\_2940846, Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:500, Catalog # Sc-847, RRID: AB\_2151439, Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ B- $\beta$  (1:500, Catalog # Sc-945, RRID: AB\_631696, Santa Cruz Biotechnology), or anti- $\beta$ -Tubulin (1:1000, Catalog # Ab6046, RRID: AB\_2210370, Abcam). Detection was performed using alkaline phosphatase or horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (1:5000, from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). ImageJ software evaluated optical density values.

### Intra-articular Injection of Cytokines

We used the previously reported procedure (8) with some modifications. Mice were injected into the articular space of knee joints with IL-1 $\beta$  (80 ng) or TNF- $\alpha$  (300 ng) alone or together with PRL (2  $\mu$ g) in a final volume of 10  $\mu$ L. Saline solution (10  $\mu$ L) was used as vehicle in controls. Mice were euthanized by carbon dioxide inhalation 24 hours after injection and knee joints processed to evaluate the quantitative real-time-PCR expression of inflammatory mediators or histological inflammatory changes.

### Histology and Evaluation of Inflammatory Infiltrates

We used the previously reported procedure (9). Knee joints were fixed for 48 hours in 10% formaldehyde in PBS (pH 7.4), decalcified in 14% EDTA in PBS for 21 days, dehydrated, and embedded in paraffin. Seven-micrometer-thick medial joint sections were stained with Harris's hematoxylin and eosin solution to evaluate anatomical changes and immune cell infiltration. The images were captured using Image-Pro Plus v 5.1.1 (Media Cybernetics Inc.) at magnification of  $\times 400$  and  $\times 600$  to identify and quantify mononuclear and polymorphonuclear cells.

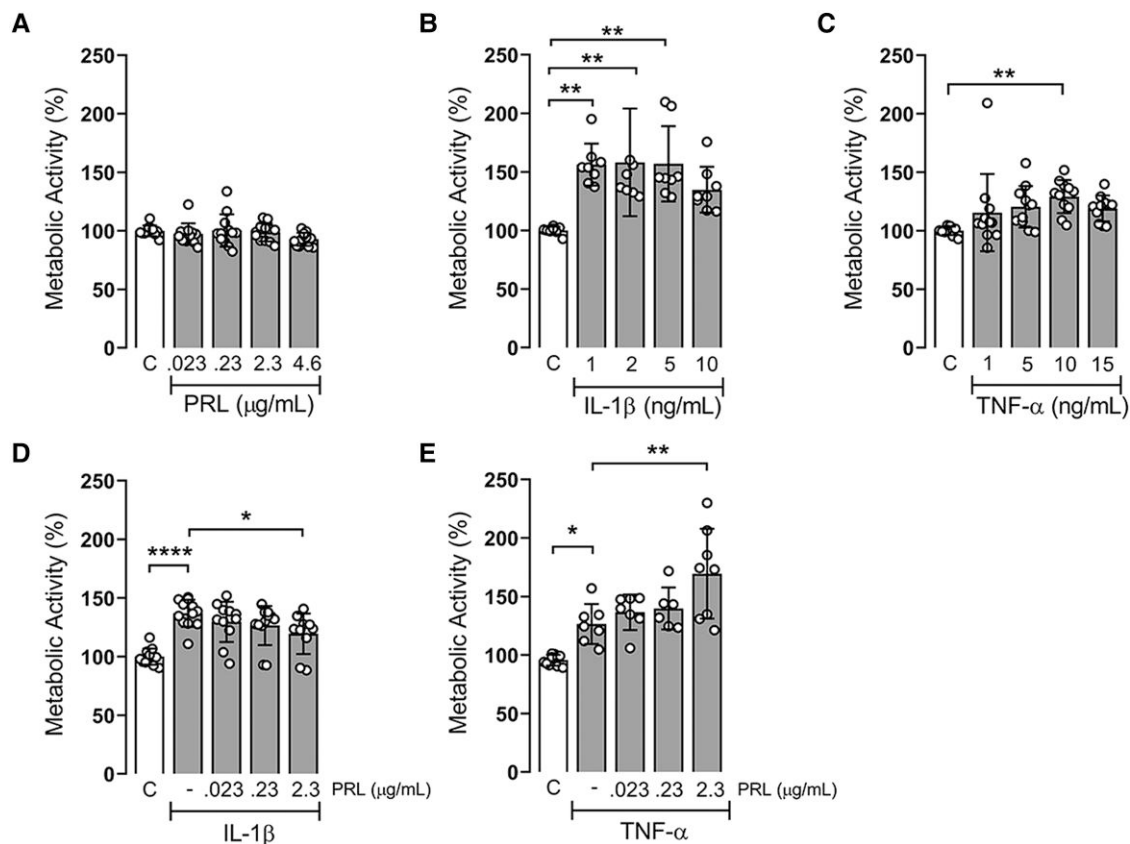
### Statistical Analysis

GraphPad Prism 8.0.1 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used. Differences between 2 groups were determined by Student *t*-test, whereas ANOVA with Tukey post hoc or Fisher least significant difference correction evaluated differences between multiple groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM with the overall significant threshold set at  $P < .05$ .

## Results

### PRL Inhibits or Stimulates the Increase in Metabolic Activity Induced by IL-1 $\beta$ or TNF- $\alpha$ in Male SFs, Respectively

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but not PRL, increased the metabolic activity of SFs as determined by the MTT assay (Fig. 1A-C). To study the interaction of PRL with the 2 pro-inflammatory cytokines, SFs were incubated with the minimum effective concentration of IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or the only effective dose of TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) in the absence or presence of different concentrations of PRL. The highest PRL concentration (2.3  $\mu$ g/mL) inhibited IL-1 $\beta$ -induced increase in metabolic activity



**Figure 1.** PRL inhibits or stimulates the increase in metabolic activity induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  in male synovial fibroblasts (SFs), respectively. Metabolic activity of SFs cultured in the absence (control [C]) or presence of different concentrations of PRL (A), IL-1 $\beta$  (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) plus different concentrations of PRL (D), and TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) plus different concentrations of PRL (E). Metabolic activity was determined by the MTT assay. Individual values are shown with open circles. Values were normalized to C and are means  $\pm$  SEM (n=8-12). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\*\* $P$ <0.0001 (1-way ANOVA, Tukey).

(Fig. 1D) but potentiated the increase in metabolic activity in response to TNF- $\alpha$  (Fig. 1E). Accordingly, PRL exerted positive and negative effects on the metabolic activity of SFs that depended on the type of proinflammatory cytokine. Dual actions were further characterized in subsequent experiments using the same treatment concentrations.

### Dual Effects of PRL do not Associate With Changes in the Survival or Proliferation of Male SFs

Because metabolic activity may reflect changes in cell survival and proliferation, the number and DNA synthesis of SFs were quantified using DNA staining (Hoechst) and Edu-DNA incorporation (click reaction), respectively (Fig. 2A). There was no difference in the number of SFs after treatment with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  with or without PRL (Fig. 2A-C). However, the proliferation of SF was reduced 4-fold after treatment with IL-1 $\beta$  (Fig. 2A and 2D), an unexpected finding given that SFs display a proliferative phenotype under inflammatory conditions (22). Nonetheless, neither TNF- $\alpha$  nor PRL modified the proliferation of SFs (Fig. 2A and 2E). The survival of SFs was directly analyzed using a cell death detection ELISA that evaluates histone-associated DNA fragments present in the cytoplasm of cells undergoing apoptosis. PRL, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  reduced the apoptosis of SFs, but PRL did not modify the level of apoptosis induced by either IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  (Fig. 2F and 2G). We conclude that the increase in metabolic activity of SFs after IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was not due

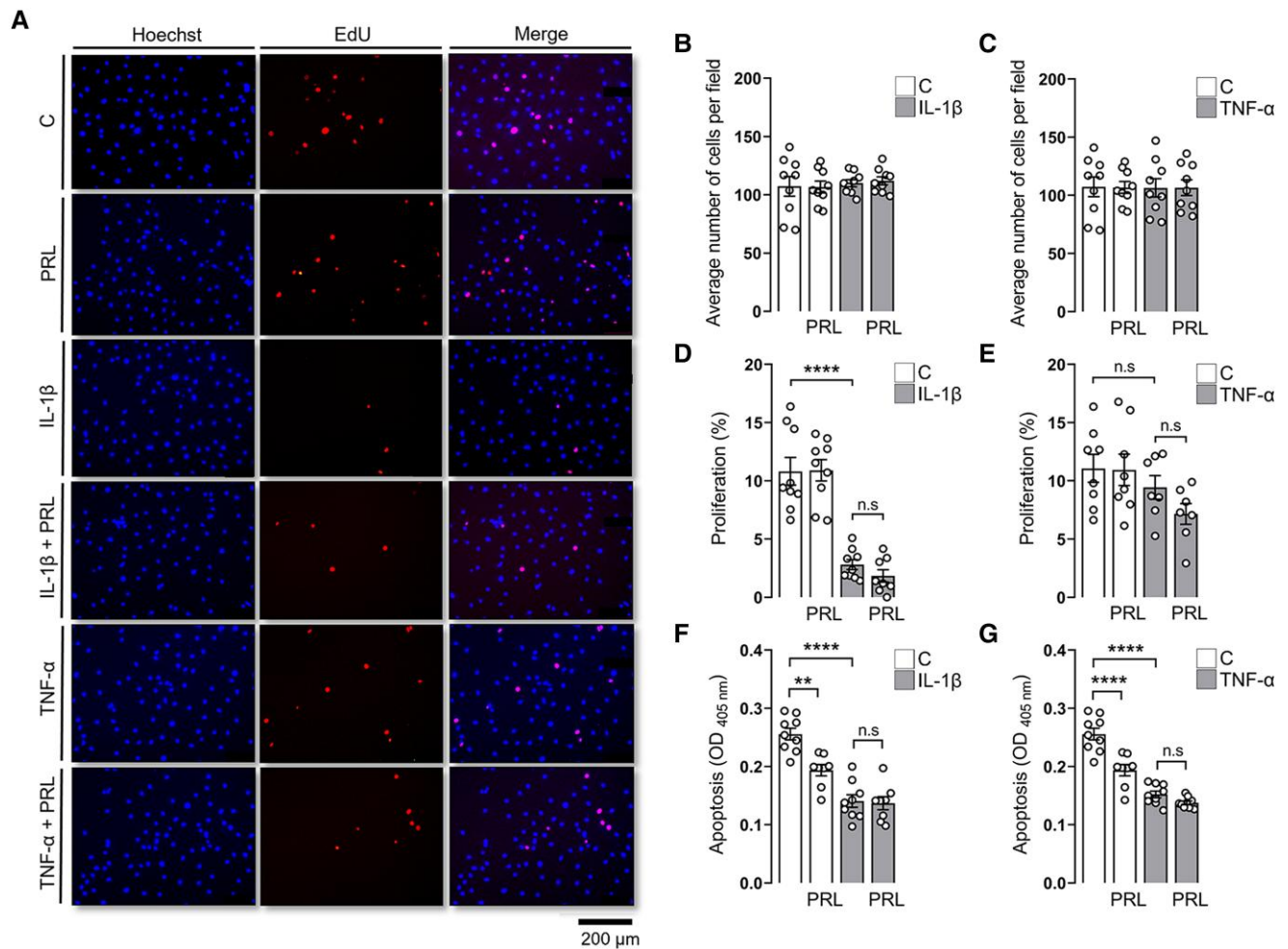
to the upregulation of proliferation and survival and, thereby, that dual actions of PRL operate at a different cellular level.

### PRL Inhibits or Stimulates the Male SF Expression of pro-inflammatory Mediators in Response to IL-1 $\beta$ or TNF- $\alpha$ , Respectively

We next investigated whether increased metabolic activity was associated with changes in the inflammatory response of SFs. As previously reported (19, 26-28), IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  stimulated the inflammatory response of SFs as revealed by the upregulation of genes encoding IL-1 $\beta$  (*Il1b*), inducible nitric oxide synthase (*Inos*), and interleukin 6 (*Il6*) (Fig. 3A and 3C). PRL inhibited the mRNA expression of the 3 pro-inflammatory mediators induced by IL-1 $\beta$  (Fig. 3A) but potentiated it in response to TNF- $\alpha$  (Fig. 3C). Dual effects of PRL were confirmed by quantifying the secreted levels of IL-6. PRL reduced and increased the IL-6 levels in the conditioned medium of SF co-incubated with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively (Fig. 3B and 3D). These findings show that PRL exerts dual actions on the inflammatory response of SF that are cytokine-specific and prompted the search for responsible mechanisms.

### IL-1 $\beta$ Increased and TNF- $\alpha$ Decreased the Expression of the $\alpha$ PRL Receptor in Male SF

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  regulated in an opposite manner the expression level of the long form of the PRL receptor ( $\alpha$ PRLR), the



**Figure 2.** Dual effects of PRL do not associate with changes in the survival or proliferation of male synovial fibroblasts (SFs). (A). Representative micrographs showing SFs stained for total (Hoescht) or newly synthesized (EdU) DNA and the merge of both labels (merge). Calibration bar = 200  $\mu$ m. Graphs show the number of cells per field and the percentage of proliferating SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (B and D) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (C and E) in the absence or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL) for 72 hours. Apoptosis was measured by the absorbance (405 nm) of DNA fragments in SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (F) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (G) in the absence or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL) for 24 hours. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM, ( $n=8-9$ ). n.s.: nonsignificant, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (1-way ANOVA, Tukey).

major isoform signaling PRL actions (29, 30). IL-1 $\beta$  increased the mRNA (Fig. 4A) and protein (Fig. 4C and 4D) levels of the  $\alpha$ PRLR in SFs, whereas both levels were reduced by TNF- $\alpha$  (Fig. 4B, C, and E). We also evaluated whether PRL modified the mRNA expression of genes encoding the IL-1 $\beta$  receptor (*Il1br*) and the TNF- $\alpha$  receptors 1 and 2 (*Tnfr1* and *Tnfr2*). As described in different in vitro models (31, 32), IL-1 $\beta$  increased the expression of *Il1br*, *Tnfr1*, and *Tnfr2*, and TNF- $\alpha$  stimulated the expression of *Il1br* and *Tnfr2* (Supplementary Fig. S1A and S1B) (60). However, PRL did not modify the mRNA expression of these receptors in the absence or presence of either cytokine (Supplementary Fig. S1A and S1B) (60). These findings suggest that the level of PRLR, but not of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  receptors, influences dual actions of PRL on SFs.

#### PRL Inhibits or Stimulates the Activation of NF- $\kappa$ B Induced by IL-1 $\beta$ or TNF- $\alpha$ , Respectively

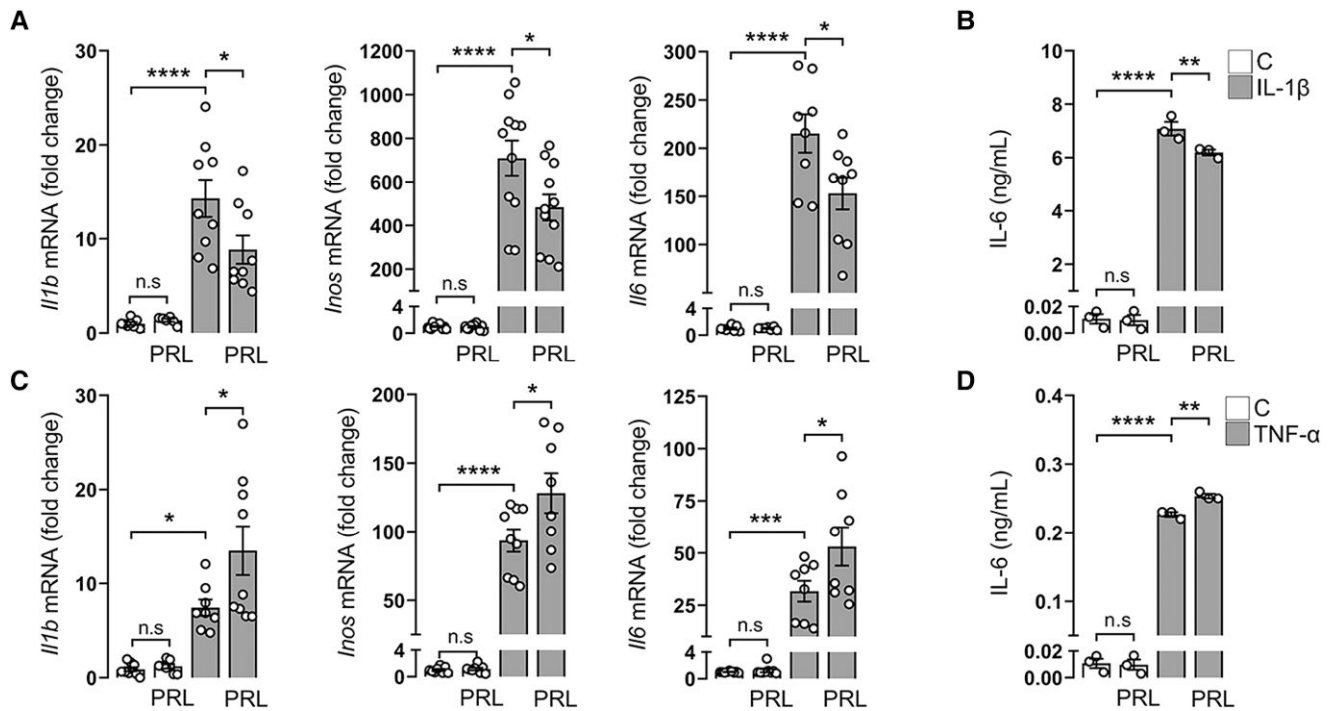
Because IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  activate NF- $\kappa$ B in SFs (33) and PRL counteracts NF- $\kappa$ B activation in degenerative processes (34), we asked whether the mechanism by which PRL exerts dual effects on SFs involved NF- $\kappa$ B. First, we confirmed that both IL-1 $\beta$

and TNF- $\alpha$  signal through NF- $\kappa$ B to promote the inflammatory response of SF (33). Treatment with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induced the nuclear translocation of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B as revealed by fluorescence immunocytochemistry and the stimulatory effect of the 2 cytokines on both, nuclear translocation, and overexpression of *Il1b*, *Inos*, and *Il6*, were prevented by the NF- $\kappa$ B inhibitor, BAY 11-7085 (Supplementary Fig. S2) (60). Next, we showed that PRL reduces (Fig. 5A and 5B) and promotes (Fig. 5A and 5C) the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in response to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively. Consistently, PRL reduced (Fig. 5D and 5E) and potentiated (Fig. 5F and 5G) the degradation by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively, of the isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  of I $\kappa$ B, a family of proteins responsible of sequestering NF- $\kappa$ B in the cytoplasm of unstimulated cells. These findings indicate that PRL inhibits and stimulates NF- $\kappa$ B activation in response to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively, and thereby that NF- $\kappa$ B mediates dual inflammatory actions of PRL on SF.

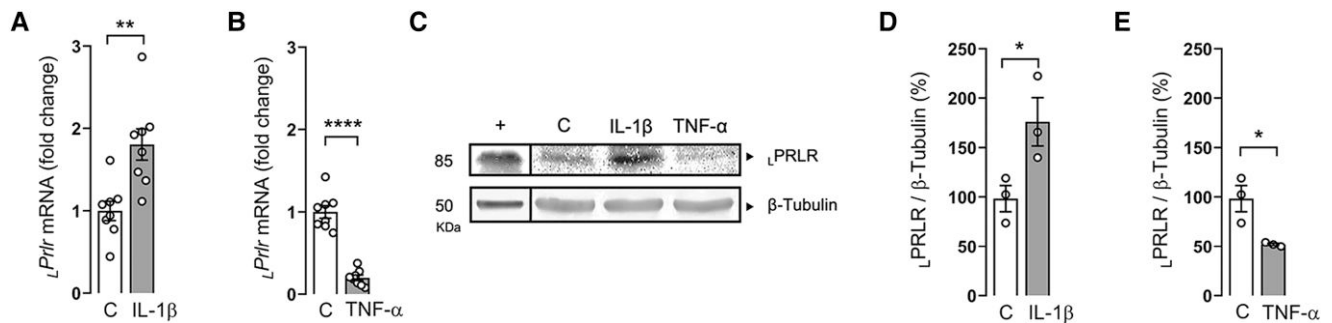
#### PRL Decreases the pro-inflammatory Effect of IL-1 $\beta$ but not that of TNF- $\alpha$ in Joints From Male Mice

To assess whether the dual effects of PRL against the 2 cytokines occurred in vivo, knee joints of male mice were injected





**Figure 3.** PRL inhibits or stimulates the male synovial fibroblast (SF) expression of pro-inflammatory mediators in response to IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ , respectively. RT-quantitative PCR quantification of genes encoding IL-1 $\beta$  (*Il1b*), iNOS (*Inos*), and IL-6 (*Il6*) and IL-6 levels in SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (A, B) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (C, D) in the absence or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL). mRNA levels were normalized to the constitutive gene (*Hprt*) and expressed relative to the untreated control (C). ELISA quantified the IL-6 protein in SF-conditioned media. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 3-12). ns: nonsignificant, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (1-way ANOVA, Tukey).

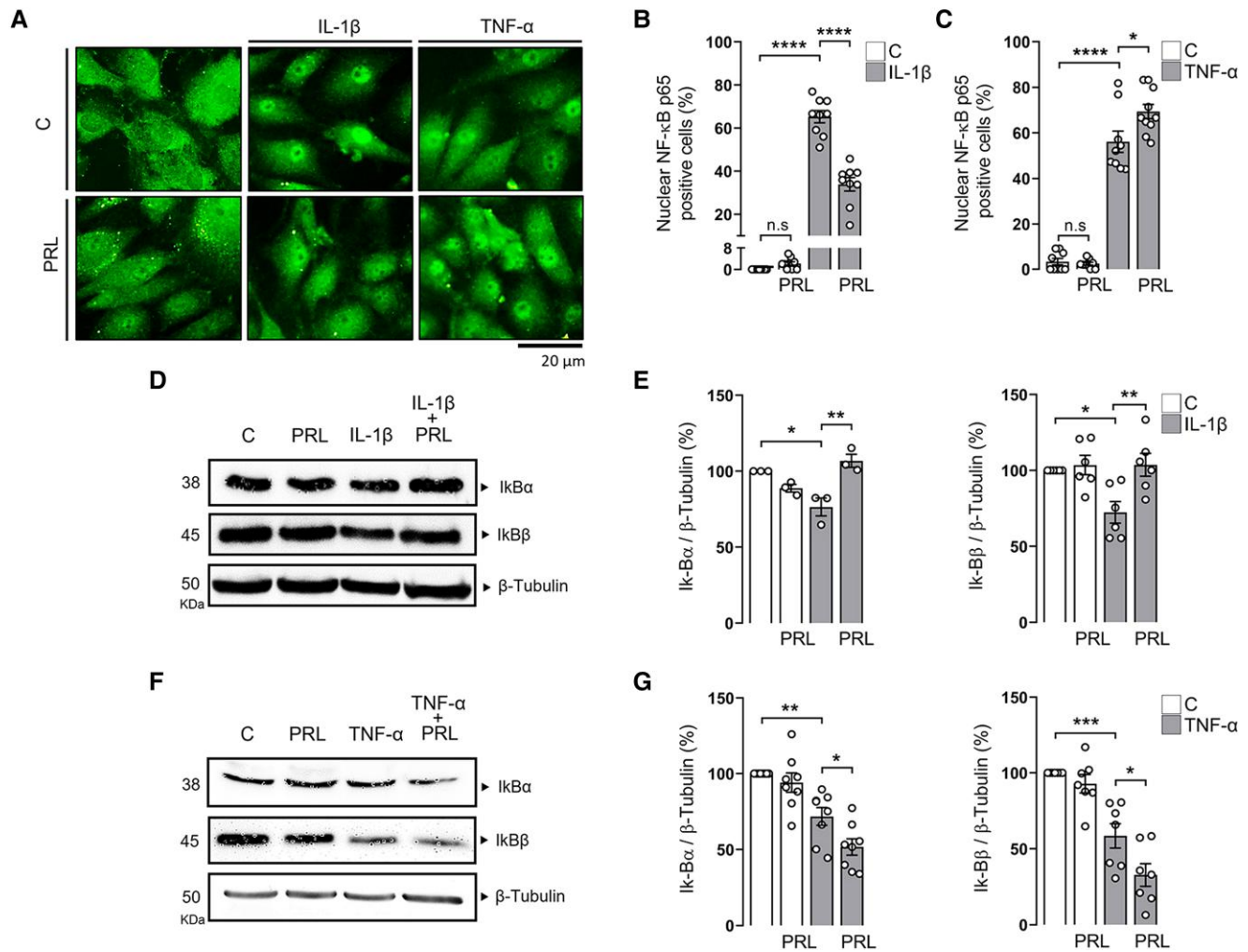


**Figure 4.** IL-1 $\beta$  increases and TNF- $\alpha$  decreases the expression of the  $L_PRLR$  ( $L_Prlr$ ) in SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (A) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (B). mRNA expression was normalized to the constitutive gene (*Hprt*) and expressed relative to the untreated control (C). (C) Representative Western blot showing the  $L_PRLR$  in SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Pregnant mouse liver extract was used as a positive control (+). Bars show densitometric quantification of the  $L_PRLR$  normalized for  $\beta$ -tubulin after treatment with IL-1 $\beta$  (D) or TNF- $\alpha$  (E). Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 3-8). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (Student t-test).

with vehicle (saline solution), IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  with or without PRL. After 24 hours, joints were processed to measure the mRNA levels of the  $L_PRLR$ , inflammatory mediators (Fig. 6), and the histological changes evaluated by hematoxylin and eosin staining (Figs. 7 and 8). Vehicle injection showed no evidence of inflammation and no significant changes in PRL-treated joints compared with vehicle-treated joints (Figs. 6-8). Treatment with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  did not modify the expression of the  $L_PRLR$  (Fig. 6A and 6C) but did increase the expression of *Il1b*, *Inos*, and *Il6* (Fig. 6B and 6D). PRL inhibited IL-1 $\beta$ -induced expression of *Il1b* and *Inos* but not that of *Il6* (Fig. 6B). By contrast, PRL did not modify the TNF- $\alpha$ -induced expression of the 3 inflammatory mediators in joints (Fig. 6D).

Histological sections of joints injected with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  showed a mild level of synovial hyperplasia (Fig. 7) with no apparent evidence of joint damage (Fig. 8A). Synovial hyperplasia was evaluated by counting the number of cell layers and thickness (in microns) comprising the intimal lining of the synovial membrane. A normal synovial membrane consisting of a distinct intimal lining of 1 to 2 cells was observed in joints injected with vehicle or PRL. The intra-articular injection of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  increased intimal lining to 4 to 6 layers, whereas cotreatment with PRL prevented IL-1 $\beta$ -induced increase in intimal hyperplasia (number of cell layers and thickness) but not that in response to TNF- $\alpha$  (Fig. 7).

The intra-articular injection of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  associated with increased synovial infiltration of mononuclear and



**Figure 5.** PRL inhibits or stimulates the activation of NF- $\kappa$ B induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ , respectively. (A) Immunofluorescence detection of NF- $\kappa$ B (p65) in synovial fibroblasts (SFs) cultured in the absence (control [C]) or presence of IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) with or without PRL (2.3  $\mu$ g/mL). Quantification of nuclei positive for NF- $\kappa$ B in SFs treated with IL-1 $\beta$  (B) or TNF- $\alpha$  (C) relative to C. Calibration bar = 20  $\mu$ m. Representative Western blot showing IkB $\alpha$  and IkB $\beta$  proteins in SFs incubated or not (control [C]) with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (D) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (F) in the absence or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL). Densitometric quantification of IkB $\alpha$  and IkB $\beta$  normalized to  $\beta$ -tubulin after treatment with IL-1 $\beta$  (E) or TNF- $\alpha$  (G) and expressed relative to C. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n=3-9). n.s.: nonsignificant, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001 (1-way ANOVA, Tukey).

polymorphonuclear cells (Fig. 8). Cotreatment with PRL effectively prevented IL-1 $\beta$ -induced increase in mononuclear and polymorphonuclear infiltration (Fig. 8A-C). For mice injected with TNF- $\alpha$  and PRL, infiltration of mononuclear cells was like that with TNF- $\alpha$  alone (Fig. 8A, B, and D). However, the TNF- $\alpha$ -induced increase in polymorphonuclear cell infiltration was significantly elevated by PRL (Fig. 8D).

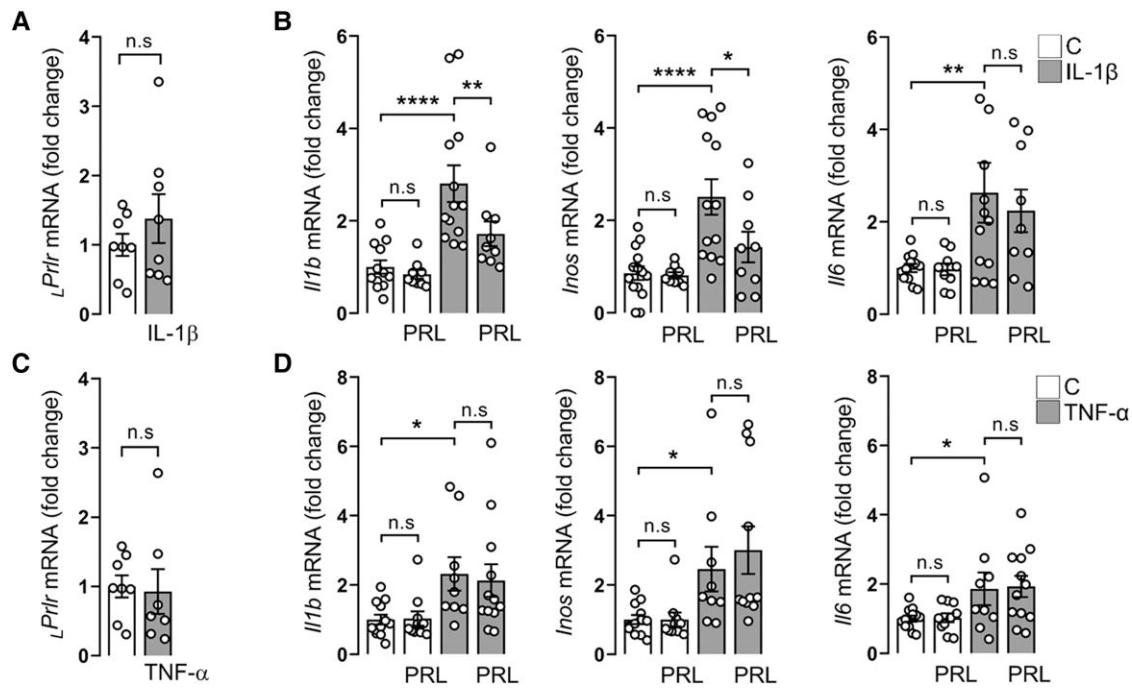
#### PRL Differential Interaction With IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ Also Occurs in the Female

Given the female preponderance of RA, we tested whether the dual actions of PRL on the inflammatory effects of the 2 cytokines operated also in females. The in vitro and in vivo results obtained in females at diestrus (Fig. 9) were essentially like those observed in males. IL-1 $\beta$  increased and TNF- $\alpha$  decreased the mRNA expression of the  $\alpha$ 1PRLR in SFs from females in culture (Fig. 9A and 9C). Likewise, PRL reduced IL-1 $\beta$ -induced expression of *Inos* and *Il6*, but not that of *Il1b* (Fig. 9B), and stimulated TNF $\alpha$ -induced expression of

all 3 inflammatory mediators (*Ilb*, *Inos*, and *Il6*) (Fig. 9D). In the in vivo condition, and like males, IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  injected into the knee joint of females did not modify the expression levels of the  $\alpha$ 1PRLR (Fig. 9E and 9G); IL-1 $\beta$  increased the expression of *Ilb*, *Inos*, and *Il6*, and PRL inhibited IL-1 $\beta$ -induced expression of *Il1b* and *Il6* but not that of *Inos* (Fig. 9F). However, in contrast to males, TNF- $\alpha$  injected into the knee joint of females did not increase the expression of proinflammatory mediators and cotreatment of TNF- $\alpha$  and PRL showed no effect (Fig. 9G). These findings provide evidence that PRL also acts on female joints to exert positive and negative actions on the inflammatory response of joint tissues.

#### Discussion

The relationship between RA and PRL has long been addressed based on the increased prevalence of the disease in women (35), the immunoenhancing properties of PRL (12), and the expression of PRL and the PRLR in synovial tissue



**Figure 6.** PRL prevents expression of pro-inflammatory mediators induced by IL-1 $\beta$ , but not by TNF- $\alpha$  in male joints. RT-quantitative PCR quantification of genes encoding the  $\text{lPrlr}$  (*lPrlr*), IL-1 $\beta$  (*Il1b*), iNOS (*Inos*), and IL-6 (*Il6*) mRNA levels in joints injected with vehicle (C, saline solution), IL-1 $\beta$  (80 ng/joint) (A, B), or TNF- $\alpha$  (300 ng/joint) (C, D) with or without PRL (2  $\mu$ g). Animals were euthanized 24 hours following administration. mRNA values were normalized to the constitutive gene (*Hprt*) and expressed relative to vehicle-injected joints. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 8$ -13). n.s.: nonsignificant, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (1-way ANOVA, Fisher least significant difference test).

of patients with RA (16). However, PRL has both stimulatory and inhibitory effects on the immune system (1, 36), and exposure to physiological hyperprolactinemia (breastfeeding and stress) (3-5), pharmacological hyperprolactinemia (1), or pharmacological hypoprolactinemia (1) associate both to high and a low risks of RA. Moreover, conflicting associations have been observed between circulating PRL levels and disease severity in patients with RA (2, 37), and both positive (8, 9) and negative (7) PRL outcomes occur in experimental models of RA. The reasons behind these contradictory observations are unclear but point toward complex interactions at the inflammatory milieu (10). Here, we show that PRL has positive or negative effects on cultured SFs and joints in both males and females that depend on its interaction with specific proinflammatory cytokines, the level of the PRLR, and the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

SFs comprise two-thirds of resident synoviocytes and are primary effectors of pannus growth, inflammation, and joint destruction in RA (38). Activated SFs acquire an invasive hyperplastic phenotype and produce a wide range of pro-inflammatory mediators, adhesion molecules, matrix metalloproteinases, and chemokines that drive tissue destruction and perpetuate inflammation through autocrine responses, neighboring cells paracrine networks, and by recruiting other cells to the synovium (39). Activation of SFs in patients with RA is partly stimulated by local proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (39).

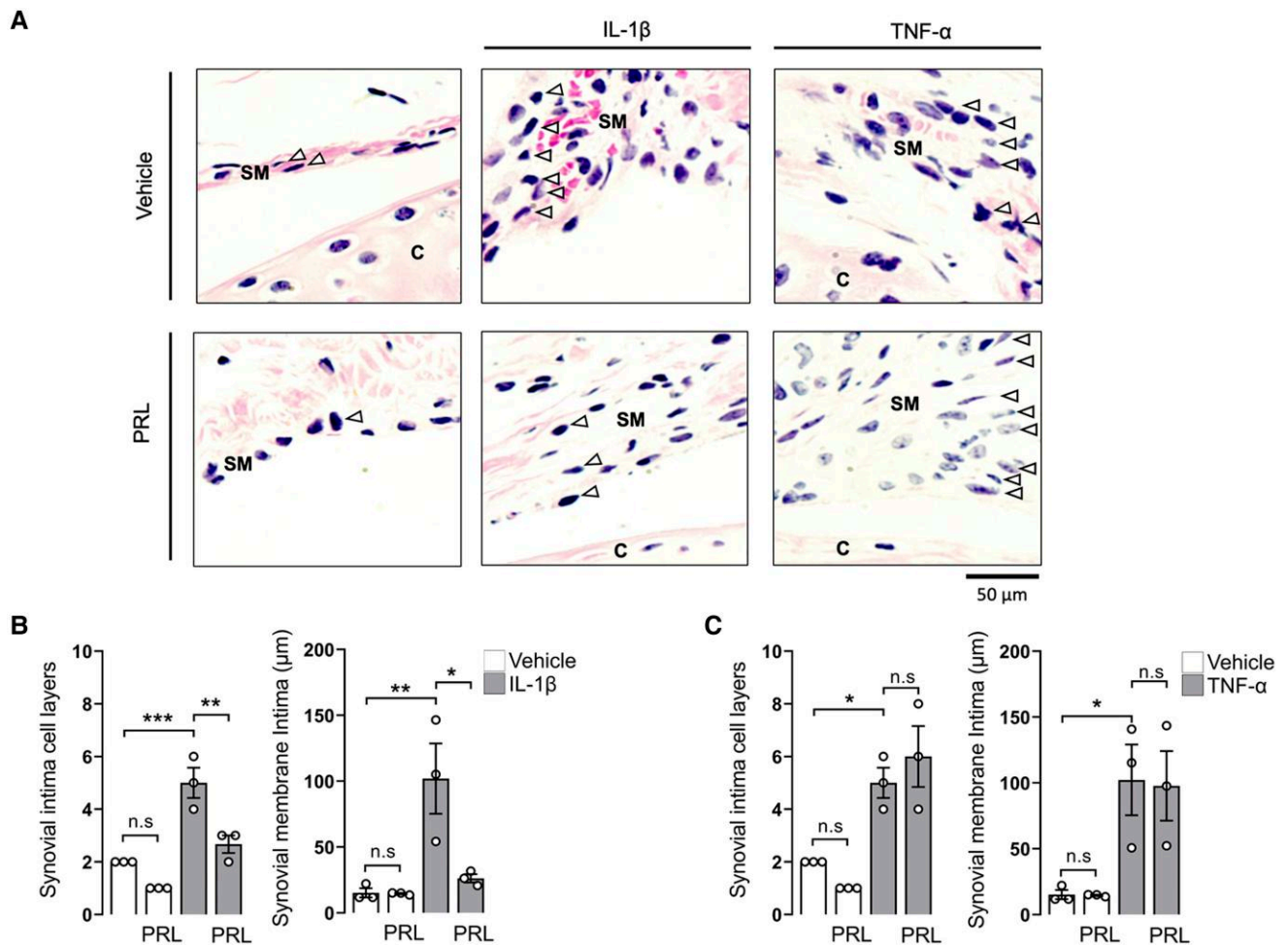
Here, we show that both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increased the metabolic activity of mouse SFs in culture and that this action does not result in increased cell proliferation or survival but rather in the enhanced production of pro-inflammatory mediators. In fact, IL-1 $\beta$  inhibited the proliferation of SF by 4-fold, whereas TNF- $\alpha$  was inactive. Our observations are consistent

with reports showing that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  do not support the growth of cultured SFs from arthritic and normal joints (40), that both cytokines promote the in vitro expression of proinflammatory mediators in SFs (41, 42), and that IL-1 $\beta$  inhibits the proliferation but promotes the secretory activity of human dental pulp fibroblasts (43). Accordingly, the production of proinflammatory mediators is a primary in vitro response of SF to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  that could be used as a model for evaluating inflammatory outcomes of PRL.

SFs are cellular targets of PRL. Rodent (9) and human (16) SFs express the  $\text{lPrlr}$ , which is the primary receptor isoform signaling PRL actions (29, 30). The  $\text{lPrlr}$  is overexpressed in arthritic joints (9, 16) and in cultured SF treated with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and interferon  $\gamma$  (9). The PRLR is upregulated in SFs from patients with RA with severe inflammation and associates with PRL-induced expression of IL-6 (16), a key pathogenic cytokine majorly produced by SFs in RA (44, 45). However, PRLR-null mice subjected to antigen-induced arthritis exhibit increased joint swelling and expression of pro-inflammatory genes (9), and PRL reduces the expression of the same pro-inflammatory mediators in the joint of rats with antigen-induced arthritis (8). Furthermore, exposure of cultured mouse SFs to PRL inhibits the upregulation of *Il1b* and *Il6* in response to IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  (9). Here, we confirm and clarify conflicting observations by showing that PRL exerts positive or negative effects on the inflammatory response of SFs that are dependent on its interplay with specific proinflammatory cytokines.

PRL inhibited the increase in metabolic activity, the mRNA expression of *Il1b*, *Inos*, and *Il6*, and the secreted levels of IL-6 in SFs exposed only to IL-1 $\beta$ . By contrast, PRL potentiated the expression of the same proinflammatory mediators in SFs exclusively exposed to TNF- $\alpha$ . That opposing actions occurred





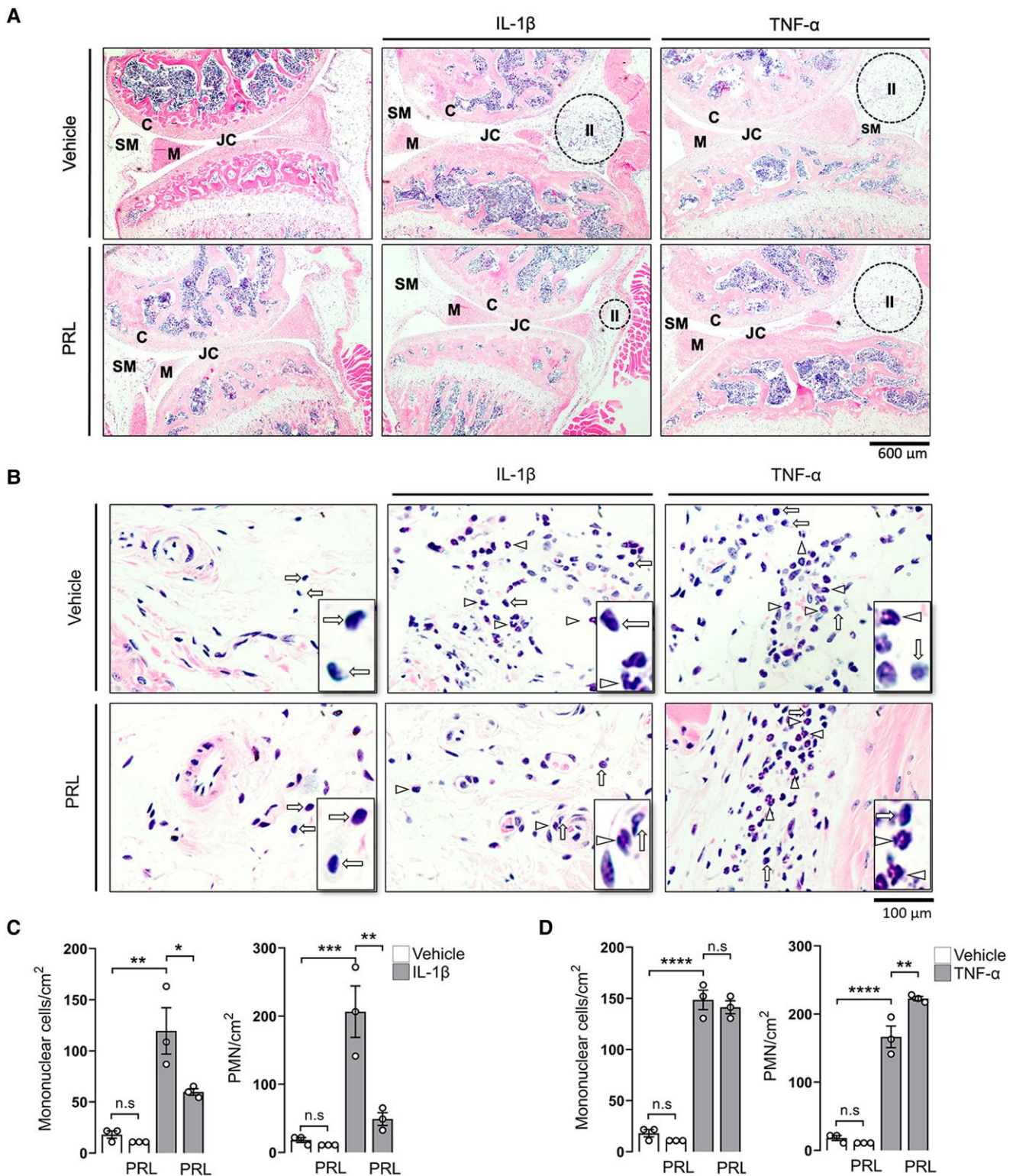
**Figure 7.** PRL prevents synovial hyperplasia in response to IL-1 $\beta$ , but not to TNF- $\alpha$  in male joints. Representative micrographs of synovial intimal layers from mice injected into the joint with vehicle (saline solution), IL-1 $\beta$  (80 ng/joint) or TNF- $\alpha$  (300 ng/joint) with or without PRL (2  $\mu$ g). A. Joint sections stained with hematoxylin and eosin. Intimal layer (arrowhead). C, cartilage; SM, synovial membrane. Calibration bar = 50  $\mu$ m. Number of cell layers and thickness ( $\mu$ m) in intimal lining of synovial membrane evaluated synovial hyperplasia (B and C). Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 3). n.s., nonsignificant, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 (1-way ANOVA, Tukey).

on male and female SFs against a specific proinflammatory cytokine supports the decisive influence of the inflammatory milieu on the outcome of PRL action. The responsible mechanisms are unknown but could involve an opposite regulation of the levels of the  $\text{I}_\text{PRLR}$  by the 2 cytokines and/or dichotomous actions of PRL on the expression of the receptors IL1R1, TNFR1, and TNFR2 mediating the proinflammatory effects of the cytokines (46, 47). In agreement with the first possibility, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  modified the expression of the  $\text{I}_\text{PRLR}$  in an opposite manner. IL-1 $\beta$  increased, whereas TNF- $\alpha$  decreased the  $\text{I}_\text{PRLR}$  mRNA and protein levels in SFs. By contrast, PRL showed no effect on the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  receptors. Although the  $\text{I}_\text{PRLR}$  is considered the major isoform signaling all PRL actions, the possibility of a dual regulation of short PRLR isoforms warrants investigation because there is evidence that short PRL receptors may silence the effect of the long form and mediate some PRL actions (30). To evaluate whether a differential regulation of the  $\text{I}_\text{PRLR}$  is associated with changes in the signaling machinery activated by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , we determined the effect of PRL on the NF- $\kappa$ B pathway in SFs exposed to either cytokine.

The NF- $\kappa$ B pathway is a major regulator of pro-inflammatory cytokine production by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (33, 41), and blockage

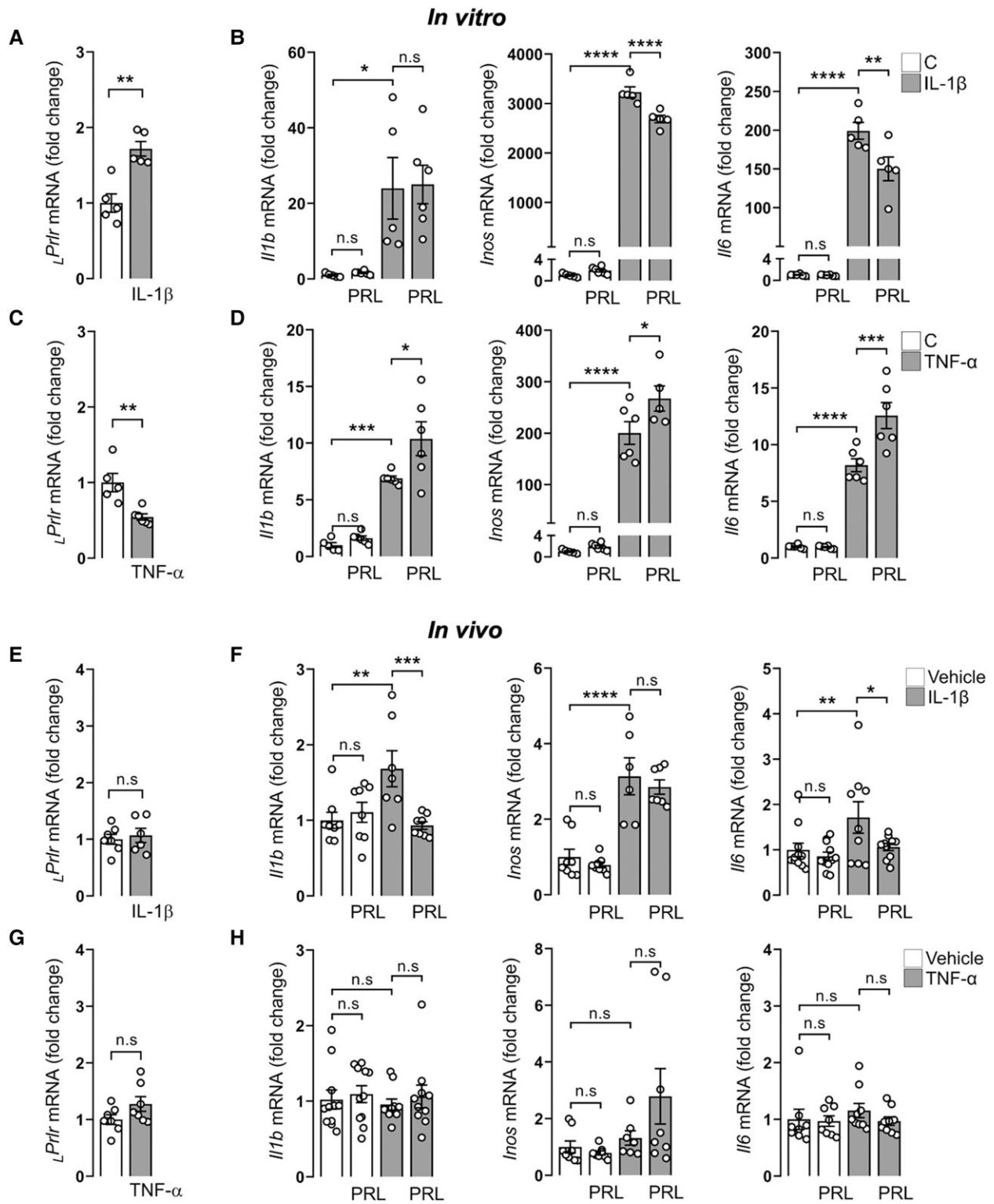
of NF- $\kappa$ B has been claimed to be beneficial for the treatment of RA (48). Signaling through the NF- $\kappa$ B pathway requires the phosphorylation/degradation of inhibitor proteins of the I $\kappa$ B family, leading to the migration of NF- $\kappa$ B to the nucleus to initiate gene transcription. We confirmed these observations by showing that an inhibitor of I $\kappa$ B phosphorylation (BAY 11-7085) prevented the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and reduced the production of pro-inflammatory mediators in response to both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Notably, PRL inhibited or stimulated the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B as result of the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  in response to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively. These findings confirmed the differential regulation by PRL of the inflammatory response of SFs to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and indicated NF- $\kappa$ B signaling as a contributing mechanism.

Different studies support opposite effects on NF- $\kappa$ B mediating dual actions of PRL on inflammatory processes. PRL retards the progression of inflammation-mediated intervertebral disk degeneration by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B (34), and PRL elicits an inflammatory response in fish via the crosstalk between the NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signaling pathways (49). Moreover, the activation of NF- $\kappa$ B by IL-1 $\beta$  in SFs associates with the upregulation of STAT1 (41) and the downregulation of STAT3 (50), and PRL signals through

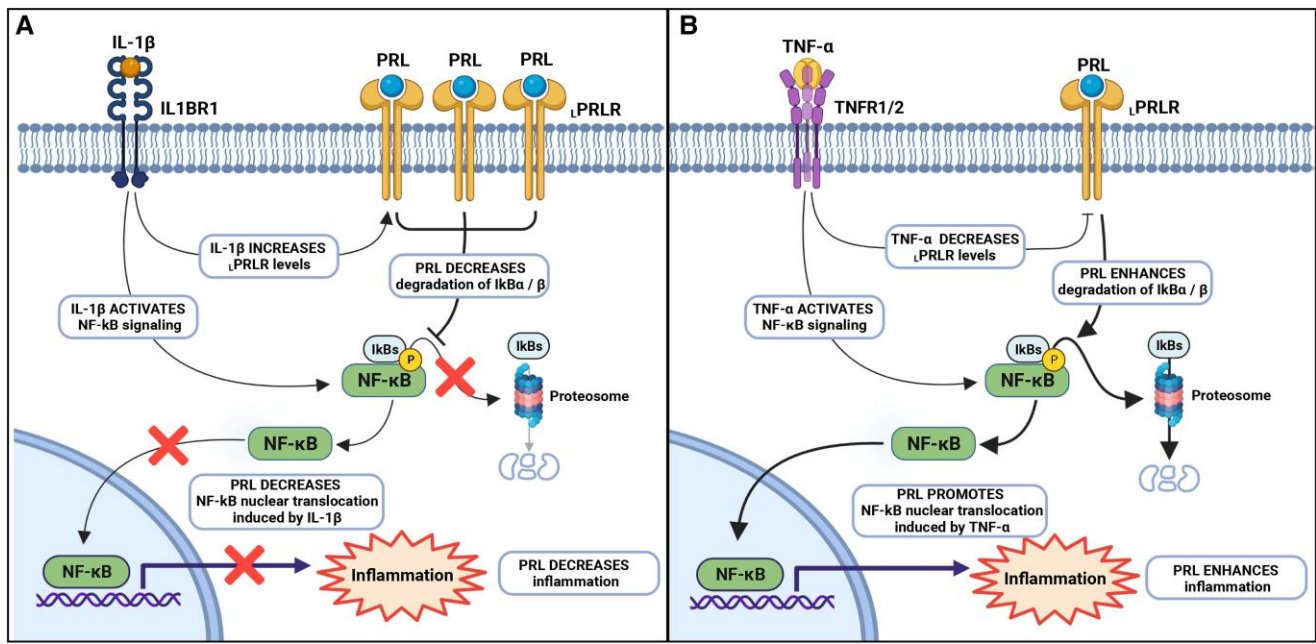


**Figure 8.** PRL prevents immune cell infiltration in response to IL-1 $\beta$ , but not to TNF- $\alpha$ . (A) Representative histological sections of knee joints from mice injected into the joint with vehicle (saline solution), IL-1 $\beta$  (80 ng/joint), or TNF- $\alpha$  (300 ng/joint) with or without PRL (2  $\mu$ g). Joint sections were stained with hematoxylin and eosin. Broken line circles highlight areas with immune cell infiltration. Calibration bar = 600  $\mu$ m. (B) Representative micrographs of areas with infiltration of mononuclear cells (arrow) and polymorphonuclear cells (PMN, arrowheads). Calibration bar = 100  $\mu$ m. (C) Infiltrated immune cell number per synovial area from mice injected into the joint with vehicle or IL-1 $\beta$  (80 ng/joint) with or without PRL. (D) Infiltrated immune cell number per synovial area from mice injected into the joint with vehicle or TNF- $\alpha$  (300 ng/joint) with or without PRL. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 3). n.s., nonsignificant, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (1-way ANOVA, Tukey). C, cartilage; II, inflammatory infiltrates; JC, joint cavity; M, meniscus; SM, synovial membrane.





**Figure 9.** PRL differential interaction with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  also occurs in the female. RT-quantitative PCR quantification of genes encoding  $LPrIr$  ( $LPrIr$ ), IL-1 $\beta$  ( $Il1b$ ), iNOS ( $Inos$ ), and IL-6 ( $Il6$ ) in female SFs incubated or not with IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) (A, B) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (C, D) in the absence or presence of PRL (2.3  $\mu$ g/mL). mRNA levels were normalized to the constitutive gene (*Hprt*) and expressed relative to the untreated control (C). Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 5-6). ns, nonsignificant, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (1-way ANOVA, Tukey). RT-quantitative PCR quantification of genes encoding  $LPrIr$  ( $LPrIr$ ), IL-1 $\beta$  ( $Il1b$ ), iNOS ( $Inos$ ), and IL-6 ( $Il6$ ) mRNA levels in joints injected with vehicle (saline solution), IL-1 $\beta$  (80 ng/joint) (E and F), or TNF- $\alpha$  (300 ng/joint) (G and H) with or without PRL (2  $\mu$ g). Animals were euthanized 24 hours after administration. mRNA values were normalized to the constitutive gene (*Hprt*) and expressed relative to vehicle-injected joints. Individual values are shown with open circles. Values are means  $\pm$  SEM (n = 8-12). n.s., nonsignificant, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (1-way ANOVA, Fisher least significant difference test).



**Figure 10.** Schematic representation of dual actions of PRL against IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fibroblasts (SFs). (A) IL-1 $\beta$  upregulates the long form of the PRL receptor (lPRLR) leading to the inhibition by PRL of the degradation of NF- $\kappa$ B inhibitors (I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ ), NF- $\kappa$ B nuclear translocation, and production of inflammatory factors. (B) TNF- $\alpha$  downregulates the lPRLR favoring the stimulation by PRL of the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ , NF- $\kappa$ B nuclear translocation, and production of inflammatory mediators. These mechanisms may work together to help balance joint inflammation in arthritis. This scheme was created with Biorender.com.

JAK2/STAT3 to protect against chondrocyte apoptosis in arthritis (8). It remains to be determined whether and how the crosstalk between NF- $\kappa$ B and JAK/STAT-signaling pathways contributes to the dual actions of PRL on SFs.

Consistent with the inflammatory role of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , their individual injection into healthy murine knee joints stimulates local inflammation (51). This model allowed us to investigate whether dual actions of PRL on joint inflammation occur in vivo because individual cytokines could be tested isolated from the many inflammatory mediators operating in arthritis. By contrast to the action on SFs in culture, the injection of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  into the knee joint of mice failed to alter the mRNA levels of the lPRLR in either sex. This difference may be explained by the contribution of other cell types and key regulators absent in the in vitro condition. In agreement, the inflammatory regulation of PRL receptors is tissue specific (52) and a combination of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ ) upregulate PRL receptors in pulmonary fibroblasts in culture (53) but downregulates lung PRL receptors in lipopolysaccharide-treated mice (52).

By evaluating the expression of pro-inflammatory genes and histological changes in joints, we were able to show that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  launched an inflammation after 24 hours of post-articular injection that was sex-related. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  produced an inflammatory response in males, whereas only IL-1 $\beta$  elicited joint inflammation in females. The lack of effect of TNF- $\alpha$  in the female is consistent with reports of increased susceptibility of male mice to immune challenge (54), including inflammatory arthritis (55). Nonetheless, consistent with our in vitro data, the effect of PRL differed between the 2 cytokines in males and females. PRL reduced the IL-1 $\beta$ -induced expression of *Il1b* and *Inos* in males and of *Inos* and *Il6* in females, failed to modify pro-inflammatory gene expression in

response to TNF- $\alpha$  in males, and was unable to modify the lack of proinflammatory action of TNF- $\alpha$  in females. Finally, the 2 cytokines resulted in mild synovial hyperplasia and immune cell infiltration in male joints and PRL prevented the inflammatory histological changes elicited by IL-1 $\beta$  but was either inactive or increased the inflammatory response to TNF- $\alpha$ . It is remarkable that despite the complexity of the in vivo system, dual inflammatory actions of PRL manifested against the 2 cytokines in males and females.

The anti-inflammatory effect of PRL against IL-1 $\beta$  and its lack of pro-inflammatory action against TNF- $\alpha$  observed in vivo are consistent with the net beneficial role of PRL observed in rodent models of RA (8, 9). However, the in vivo stimulation by PRL of TNF- $\alpha$ -induced polymorphonuclear infiltration is also consistent with reports showing that PRL stimulates extravasation of leukocytes under inflammatory conditions (56-58) and promotes the adhesion of immune cells to vascular endothelium (59). The challenge is understanding the relative contribution of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , or other cytokines to inflammatory reactions and when and how PRL mechanistically interacts with each of them to influence the inflammatory response.

In summary, our study points to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  as major cytokines influencing the outcome of PRL action in joint inflammation (Fig. 10). IL-1 $\beta$  upregulates the lPRLR in SFs in association with the blockage by PRL of NF- $\kappa$ B signaling and expression of pro-inflammatory mediators. In contrast, TNF- $\alpha$  downregulates the expression of the lPRLR in SFs in association with PRL overactivation of NF- $\kappa$ B signaling and increased production of pro-inflammatory factors. Because upregulation of the PRLR results in an anti-inflammatory action, we propose that PRL signals to inhibit inflammation in joint tissues. A proposal consistent with arthritis being more severe in mice null for the PRLR (9). Furthermore, the fact

that the pro-inflammatory effect of PRL associated with the downregulation of the PRLR implies mechanisms activated by TNF- $\alpha$  and indirectly promoted by PRL. One such mechanism could involve the proteolytic cleavage of PRL to vasoinhibin, a PRL fragment that stimulates the inflammatory phenotype of SF via NF- $\kappa$ B signaling (13). In agreement, proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , upregulate matrix metalloproteases in the arthritic joint that cleave PRL to vasoinhibin and result in higher levels of vasoinhibin in the circulation (13).

Similarities between males and females emphasize the significance of dual effects of PRL on joint inflammation that likely extend to other cells, inflammatory mediators (vasoinhibin), and signaling pathways. However, dissimilarities between the in vitro and in vivo condition highlight the complexity of the regulation exerted upon the PRL receptor and the action of key regulators (TNF- $\alpha$ ). Further research is needed to substantiate the findings in males and in females across the estrus cycle and reproductive states with the final goal of gaining insights into the pathophysiology of RA and the development of new treatments.

## Acknowledgments

The authors thank Fernando López Barrera, Alejandra Castilla, María A. Carbajo, Martín García Servín, and Ericka A. de los Ríos for excellent technical assistance.

## Funding

The study was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Grant IN202321) to C.C. J.F.G.R. is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received fellowship 921797 from the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT).

## Disclosures

J.F.G.-R., G.O., O.F.M.-D., J.F.-C., X.R.-H., F.M., M.G.L.-C., and G.M.d.I.E. have nothing to disclose. C.C. is an Editorial Board member for *Endocrinology*.

## Data Availability

Original data generated or analyzed during this study are included in this published article or in the data repository listed in References.

## References

- Clapp C, Adan N, Ledesma-Colunga MG, Solis-Gutierrez M, Triebel J, de la Escalera GM. The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(15):2929-2948.
- Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H, et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1109(1):385-400.
- Brennan P, Silman A. Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994;37(6):808-813.
- Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheumatol*. 2004;50(11):3458-3467.
- Cutolo M, Straub RH. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(5-6):277-282.
- Ochoa-Amaya JE, Malucelli BE, Cruz-Casallas PE, Nasello AG, Felicio LF, Carvalho-Freitas MIR. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(6):386-395.
- Neidhart M, Flückiger E. Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology*. 1992;77(3):449.
- Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3902-3913.
- Ledesma-Colunga MG, Adan N, Ortiz G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):93.
- Clapp C, Ortiz G, Garcia-Rodrigo JF, et al. Dual roles of prolactin and vasoinhibin in inflammatory arthritis. *Front Endocrinol*. 2022;13:905756.
- Ricken AM, Traenkner A, Merkwitz C, Hummitzsch K, Grosche J, Spänel-Borowski K. The short prolactin receptor predominates in endothelial cells of micro- and macrovascular origin. *J Vasc Res*. 2007;44(1):19-30.
- Yu-Lee L-Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57(1):435-455.
- Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z, et al. Vasoinhibin is generated and promotes inflammation in mild antigen-induced arthritis. *Endocrinology*. 2022;163(5):bqac036.
- Clapp C, Thebault S, Macotela Y, Moreno-Carranza B, Triebel J, Martínez de la Escalera G. Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:83-95.
- Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun*. 1992;6(4):409-417.
- Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999;26(9):1890-1900.
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an angiogenic 16kDa prolactin. *J Cell Sci*. 2006;119(9):1790-1800.
- Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004;43(suppl\_3):iii2-iii9.
- Farrugia M, Baron B. The role of TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. *J Clin Transl Res*. 2016;2(3):84-90.
- Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30(5):1-6.
- Edrees A, Misra S, Abdou N. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(4):469-474.
- Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233(1):233-255.
- Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol*. 2017;41(6):919-925.
- Robles JP, Zamora M, Siqueiros-Marquez L, et al. The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis*. 2022;25(1):57-70.
- Macotela Y, Mendoza C, Corbacho AM, et al. 16K Prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblast. *J Endocrinol*. 2002;175(3):R13-R18.

26. Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology*. 1989;66(2):196-200.
27. Nadiv O, Beer Y, Goldberg M, Agar G, Loos M, Katz Y. Decreased induction of IL-1beta in fibroblast-like synoviocytes: a possible regulatory mechanism maintaining joint homeostasis. *Mol Immunol*. 2007;44(12):3147-3154.
28. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al. The role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology*. 2002;41(3):329-337.
29. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 1998;19(3):225-268.
30. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(6):362-368.
31. Friedman WJ. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Exp Neurol*. 2001;168(1):23-31.
32. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1 $\beta$  augments TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(5):273-284.
33. Aupperle KR, Bennett BL, Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. NF- $\kappa$ B regulation by I $\kappa$ B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol*. 2001;166(4):2705-2711.
34. Wu X, Liu Y, Guo X, et al. Prolactin inhibits the progression of intervertebral disc degeneration through inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway in rats. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):1-11.
35. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2002;4:1-8.
36. Pereira Suarez AL, López-Rincón G, Martínez Neri PA, Estrada-Chávez C. Prolactin in inflammatory response. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:243-264.
37. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2007;6(8):537-542.
38. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*. 2005;115(2):118-128.
39. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(1):24-33.
40. Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest*. 1989;83(4):1267-1276.
41. Yang J, Wang J, Liang X, et al. IL-1 $\beta$  increases the expression of inflammatory factors in synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes via activation of the NF- $\kappa$ B-mediated ERK-STAT1 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019;20(6):4993-5001.
42. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, et al. TNF $\alpha$  induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):928-938.
43. Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 $\beta$  on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Endod*. 1998;24(6):409-413.
44. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest*. 1989;83(2):585-592.
45. Choi HM, Oh DH, Bang JS, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. Differential effect of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  on the production of IL-6, IL-8 and PGE2 in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatol Int*. 2010;30(8):1025-1033.
46. Zhang H, Xiao W. TNFR1 And TNFR2 differentially mediate TNF- $\alpha$ -induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biol Int*. 2017;41(4):415-422.
47. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27.
48. Li G, Xia Z, Liu Y, et al. SIRT1 Inhibits rheumatoid arthritis fibroblast-like synovocyte aggressiveness and inflammatory response via suppressing NF- $\kappa$ B pathway. *Biosci Rep*. 2018;38(3):BSR20180541.
49. Olavarría VH, Sepulcre MP, Figueroa JE, Mulero V. Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1 $\beta$  in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Immunol*. 2010;185(7):3873-3883.
50. Lou L, Liu Y, Zhou J, et al. Chlorogenic acid and luteolin synergistically inhibit the proliferation of interleukin-1beta-induced fibroblast-like synoviocytes through regulating the activation of NF-kappaB and JAK/STAT-signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(6):499-507.
51. Bolon B, Campagnuolo G, Zhu L, Duryea D, Zack D, Feige U. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  produce distinct, time-dependent patterns of acute arthritis in the rat knee. *Vet Pathol*. 2004;41(3):235-243.
52. Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, et al. Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(4):E750-E757.
53. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, et al. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*. 2003;544(1-3):171-175.
54. Gahima I, Twizeyimana E, LuckGonzales E, Remonde CG, Jeon SJ, Shin CY. Strain, age, and gender differences in response to lipopolysaccharide (LPS) animal model of sepsis in mice. *Yakbak Hoeji*. 2021;65(1):17-22.
55. Schuh BM, Macáková K, Feješ A, et al. Sex differences in long-term effects of collagen-induced arthritis in middle-age mice. *Front Physiol*. 2023;14:1195604.
56. Tangbanluekal L, Robinette C. Prolactin mediates estradiol-induced inflammation in the lateral prostate of Wistar rats. *Endocrinology*. 1993;132(6):2407-2416.
57. Olson KK, Townson DH. Prolactin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and the accumulation of monocytes/macrophages during regression of the rat corpus luteum. *Biol Reprod*. 2000;62(6):1571-1578.
58. Meli R, Gualillo O, Raso GM, Di Carlo R. Further evidence for the involvement of prolactin in the inflammatory response. *Life Sci*. 1993;53(6):PL105-PL110.
59. de Oca PM, Macotela Y, Nava G, Lopez-Barrera F, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Lab Invest*. 2005;85(5):633-642.
60. Garcia-Rodrigo JF, Ortiz G, Martinez-Diaz OF, et al. Supplementary data for "Prolactin inhibits or stimulates the inflammatory response of joint tissues in a cytokine-dependent manner." Figshare. Deposited July 5, 2023. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.23631438.v1>