

## Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis

Norma Adán, ... , Stéphanie Thebault, Carmen Clapp

*J Clin Invest.* 2013;123(9):3902-3913. <https://doi.org/10.1172/JCI69485>.

Research Article

Inflammation

Chondrocytes are the only cells in cartilage, and their death by apoptosis contributes to cartilage loss in inflammatory joint diseases, such as rheumatoid arthritis (RA). A putative therapeutic intervention for RA is the inhibition of apoptosis-mediated cartilage degradation. The hormone prolactin (PRL) frequently increases in the circulation of patients with RA, but the role of hyperprolactinemia in disease activity is unclear. Here, we demonstrate that PRL inhibits the apoptosis of cultured chondrocytes in response to a mixture of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ) by preventing the induction of p53 and decreasing the BAX/BCL-2 ratio through a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. Local treatment with PRL or increasing PRL circulating levels also prevented chondrocyte apoptosis evoked by injecting cytokines into the knee joints of rats, whereas the proapoptotic effect of cytokines was enhanced in PRL receptor-null (*Prlr*<sup>-/-</sup>) mice. Moreover, eliciting hyperprolactinemia in rats before or after inducing the adjuvant model of inflammatory arthritis reduced chondrocyte apoptosis, proinflammatory cytokine expression, pannus formation, bone erosion, joint swelling, and pain. These results reveal the protective effect of PRL against inflammation-induced chondrocyte apoptosis and the therapeutic potential of hyperprolactinemia to reduce permanent joint damage and inflammation in RA.



# Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis

Norma Adán,<sup>1</sup> Jessica Guzmán-Morales,<sup>1</sup> María G. Ledesma-Colunga,<sup>1</sup> Sonia I. Perales-Canales,<sup>1</sup> Andrés Quintanar-Stéphano,<sup>2</sup> Fernando López-Barrera,<sup>1</sup> Isabel Méndez,<sup>1</sup> Bibiana Moreno-Carranza,<sup>1</sup> Jakob Triebel,<sup>1</sup> Nadine Binart,<sup>3</sup> Gonzalo Martínez de la Escalera,<sup>1</sup> Stéphanie Thebault,<sup>1</sup> and Carmen Clapp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México. <sup>2</sup>Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. <sup>3</sup>INSERM U693, Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France.

**Chondrocytes are the only cells in cartilage, and their death by apoptosis contributes to cartilage loss in inflammatory joint diseases, such as rheumatoid arthritis (RA). A putative therapeutic intervention for RA is the inhibition of apoptosis-mediated cartilage degradation. The hormone prolactin (PRL) frequently increases in the circulation of patients with RA, but the role of hyperprolactinemia in disease activity is unclear. Here, we demonstrate that PRL inhibits the apoptosis of cultured chondrocytes in response to a mixture of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ) by preventing the induction of p53 and decreasing the BAX/BCL-2 ratio through a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. Local treatment with PRL or increasing PRL circulating levels also prevented chondrocyte apoptosis evoked by injecting cytokines into the knee joints of rats, whereas the proapoptotic effect of cytokines was enhanced in PRL receptor-null (*Prlr*<sup>-/-</sup>) mice. Moreover, eliciting hyperprolactinemia in rats before or after inducing the adjuvant model of inflammatory arthritis reduced chondrocyte apoptosis, proinflammatory cytokine expression, pannus formation, bone erosion, joint swelling, and pain. These results reveal the protective effect of PRL against inflammation-induced chondrocyte apoptosis and the therapeutic potential of hyperprolactinemia to reduce permanent joint damage and inflammation in RA.**

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune inflammatory disease with a worldwide prevalence of 1% to 2%. Autoimmunity followed by the articular infiltration of leukocytes and hyperplasia of synovial cells lead to the development of an invasive inflammatory pannus that destroys the adjacent cartilage and bone. Locally produced cytokines are crucial for initiating the inflammatory process and destroying articular tissue (1). Among these cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  stimulate both chondrocyte apoptosis and cartilage extracellular matrix degradation, and their inhibition ameliorates joint destruction (1–4). Transgenic mice expressing TNF- $\alpha$ , a model of polyarthritis (5), display chondrocyte apoptosis before the onset of full arthritis, suggesting that cytokine-induced chondrocyte apoptosis is a primary cause of, rather than an event secondary to, cartilage matrix breakdown (6). Thus, factors able to counteract chondrocyte apoptosis under inflammatory conditions are relevant for the treatment of RA (7–11). One such factor is prolactin (PRL).

PRL acts both as a circulating hormone and a cytokine to regulate the function of a wide variety of tissues, including cartilage. PRL and the PRL receptor are expressed in chondrocytes (12, 13), where this hormone can promote differentiation and survival. PRL

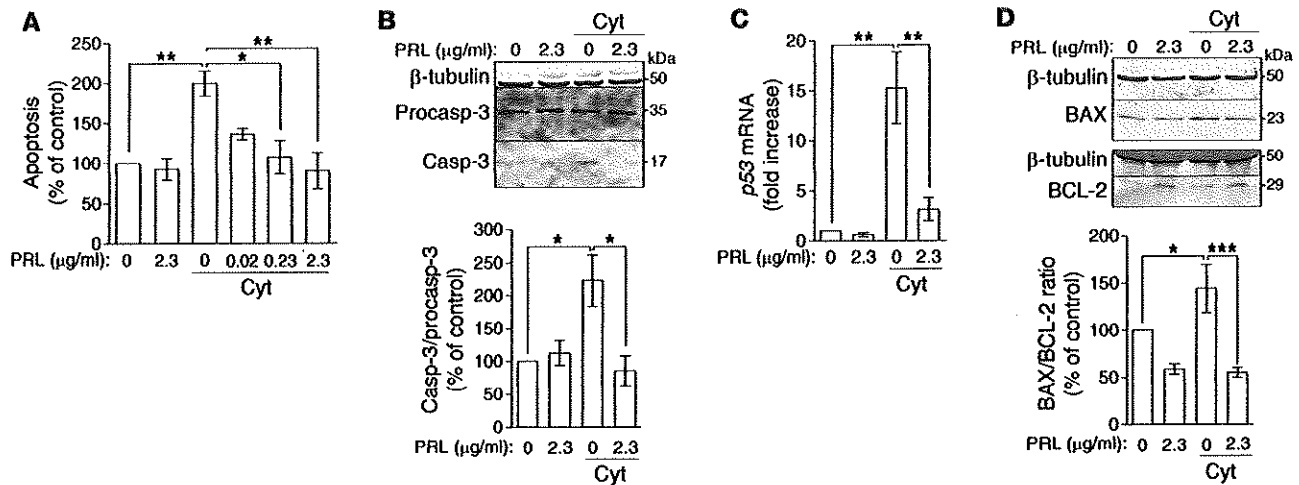
stimulates the synthesis of proteoglycans and type II collagen by bone marrow-derived chondrocytic mesenchymal cells (14), and it inhibits the apoptosis of articular chondrocytes induced by serum deprivation (13). The action of PRL on chondrocyte survival may be relevant in RA. PRL is present in RA synovial fluid (14, 15), is produced by RA synovial cells (16), and can influence cartilage survival by exerting immunoregulatory effects. The PRL receptor is a member of the hematopoietin/cytokine receptor superfamily and is expressed in a variety of immune cells, in which this hormone can be proinflammatory or antiinflammatory by regulating proliferation, survival, and the release of inflammatory mediators (17).

Given that cytokine-induced chondrocyte apoptosis contributes to cartilage destruction in RA (1, 2, 6, 9), we investigated the survival effect of PRL on chondrocytes treated *in vitro* or *in vivo* with a mixture of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  (Cyt) and whether this effect protects against cartilage destruction in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis in rats. We demonstrate that PRL treatment inhibits, and PRL receptor deficiency enhances, Cyt-induced cartilage apoptosis and that the PRL effect on survival occurs in chondrocytes via a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. We also show that hyperprolactinemia promotes the survival of arthritic cartilage by blocking the expression of proinflammatory cytokines and their proapoptotic effect on chondrocytes and that PRL delays the onset and ameliorates the severity of inflammatory arthritis. We conclude that current medications able to increase prolactinemia constitute novel potential therapies to control inflammation-driven cartilage degradation and joint damage in RA.

**Authorship note:** Norma Adán, Jessica Guzmán-Morales, and María G. Ledesma-Colunga contributed equally to this work. Sonia I. Perales-Canales is deceased.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest*. 2013;123(9):3902–3913. doi:10.1172/JCI69485.



**Figure 1**

PRL inhibits Cyt-induced apoptosis of chondrocytes in culture. (A) Primary cultures of rat chondrocytes were challenged with Cyt, combined or not with different concentrations of PRL, and apoptosis was evaluated at 24 hours by ELISA ( $n = 3-6$ ). (B) Representative Western blot of procaspase-3 and active caspase-3 (Procasp-3 and Casp-3, respectively) in lysates of chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 6 hours. The graph shows the quantification of active caspase-3 by densitometry after normalization to procaspase-3 ( $n = 3$ ). (C) qRT-PCR-based quantification of *p53* mRNA levels ( $n = 3$ ) in chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 24 hours. (D) Representative Western blot of BAX and BCL-2 in chondrocytes incubated or not with Cyt in the absence or presence of PRL for 4 hours. The graph shows the quantification of BAX/BCL-2 by densitometry ( $n = 3$ ). Values are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

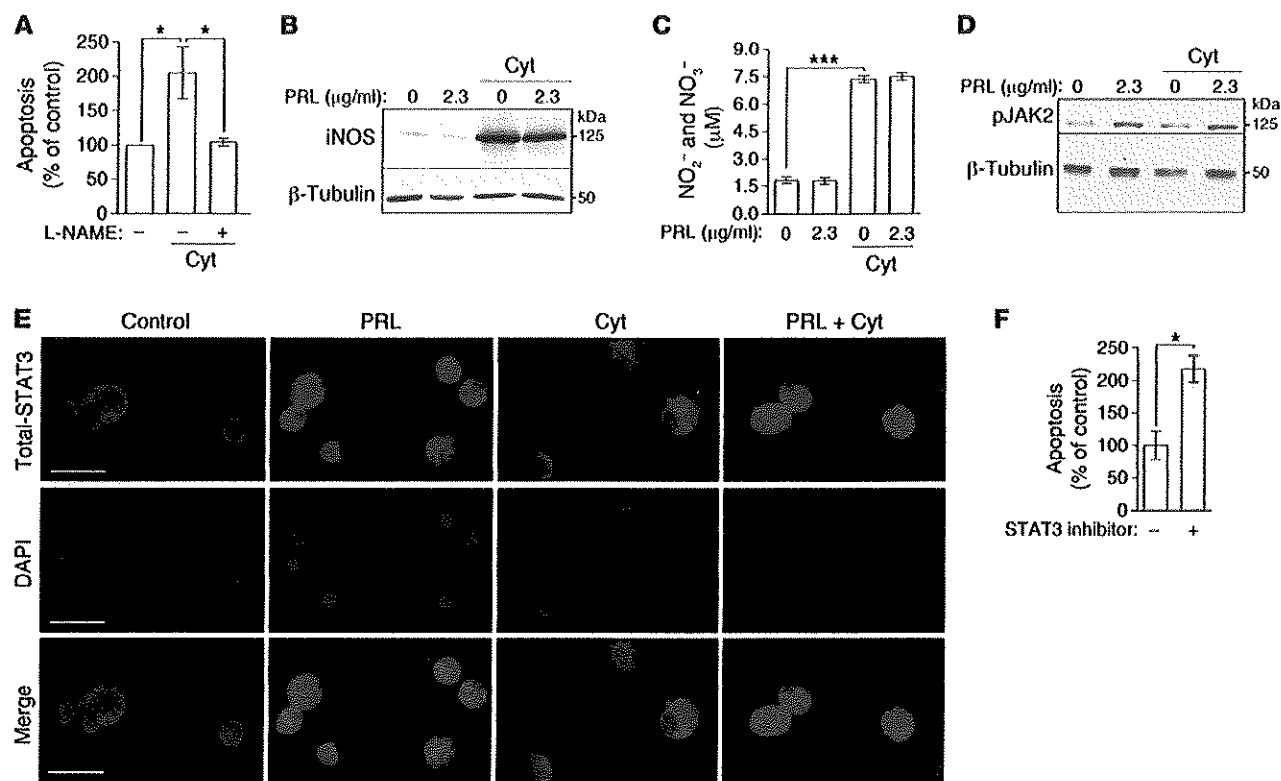
## Results

**PRL blocks Cyt-induced apoptosis of chondrocytes in culture by a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway.** We first studied whether PRL can act on chondrocytes to inhibit the proapoptotic effect of Cyt using primary cultures of rat articular chondrocytes. Cyt induced a 2-fold increase in chondrocyte apoptosis, as determined by chondrocyte internucleosomal DNA fragmentation measured by ELISA, and this increase was blocked in a dose-dependent manner by the coadministration of PRL (Figure 1A). The antiapoptotic effect of PRL was confirmed by Western blot analysis of procaspase-3 cleavage to the caspase-3 active form (Figure 1B). Cyt treatment enhanced the levels of active caspase-3 as compared with those after no treatment, and PRL blocked the Cyt-induced increase of active caspase-3. The graph in Figure 1B shows quantification of active caspase-3 after normalization for the amount of total procaspase-3 on the blot. We also investigated the expression of proteins that regulate apoptosis. Upon treatment with Cyt, there was a 15-fold increase in the mRNA expression of proapoptotic *p53*, as determined by qRT-PCR, and this increase was significantly reduced by PRL (Figure 1C). Also, Western blot analysis showed that PRL prevented the increase in the levels of proapoptotic BAX induced by Cyt and increased the levels of antiapoptotic BCL-2, resulting in a significant reduction in the BAX/BCL-2 ratio (Figure 1D).

Because NO produced by iNOS is a main factor mediating the effect of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  on chondrocyte apoptosis (3, 4, 18), we tested whether the inhibition of Cyt-induced iNOS protein expression/NO production mediates the survival effect of PRL. Similar to PRL, addition of the NOS inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (19) prevented Cyt-induced chondrocyte apoptosis (Figure 2A). However, PRL had no apparent effect on Cyt-induced upregulation of iNOS protein measured by Western blot (Figure 2B) or of the NO metabolites, nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and

nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), evaluated by the Griess reaction (Figure 2C) in chondrocyte lysates or conditioned media, respectively. This indicates that inhibition of Cyt-induced apoptosis by PRL occurs through a NO-independent pathway. We next examined activation of JAK2/STAT3, a known PRL signaling pathway (20) that is implicated in chondrocyte survival (21). In the absence and presence of Cyt, addition of PRL to cultured chondrocytes stimulated the phosphorylation/activation of JAK2, as indicated by Western blotting (Figure 2D), and the activation of STAT3, as measured by its nuclear translocation (Figure 2E). STAT3 immunoreactivity was predominantly distributed throughout the cytoplasm, and treatment with PRL increased the localization of STAT3 immunostaining in the cell nucleus, indicative of STAT3 activation. Because incubation of chondrocytes with the STAT3 inhibitor S31-201 (22) resulted in chondrocyte apoptosis (Figure 2F), it is possible that activation of the JAK2/STAT3 pathway by PRL mediates its inhibitory effect on Cyt-induced chondrocyte apoptosis.

**PRL inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by the intra-articular injection of Cyt.** To assess the survival action of PRL in vivo, Cyt with or without PRL were injected into the intra-articular space of knee joints of normoprolactinemic rats. Also, Cyt were injected in rats rendered hyperprolactinemic by placing 2 anterior pituitary glands (APs) under a kidney capsule for 15 days (23). After 48 hours, Cyt-injected knees showed a positive TUNEL signal on the outer border of the articular cartilage, visualized as a continuous fluorescent line, which was absent in the vehicle-injected controls (Figure 3A). The TUNEL-positive signal was located in chondrocytes (Figure 3A, inset), in which apoptosis was confirmed by active caspase-3 immunostaining and DAPI-DNA labeling (Figure 3B). There was no positive TUNEL reaction in the articular cartilage of knees coinjected with Cyt and PRL (Figure 3C) or in AP-grafted rats injected with Cyt (Figure 3E). Inhibition of the Cyt effect by PRL and AP grafts was statistically significant after quantifying



**Figure 2**

PRL inhibits Cyt-induced chondrocyte apoptosis by a NO-independent, JAK2/STAT3-dependent pathway. (A) Apoptosis evaluated by ELISA in chondrocytes incubated with Cyt in the presence or absence of the NO inhibitor L-NAME for 24 hours ( $n = 3-6$ ). (B) Western blot analysis of iNOS ( $n = 3$ ) and (C) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations ( $n = 7$ ) after incubating or not incubating chondrocytes with Cyt in the absence or presence of PRL for 6 and 24 hours, respectively. (D) Representative Western blot of phosphorylated JAK2 (pJAK2) in chondrocytes incubated with the various treatments for 30 minutes ( $n = 3$ ). (E) Representative immunostaining for total STAT3 and DAPI in cultured chondrocytes treated with or without (control) PRL (2.3 μg/ml), Cyt, or PRL and Cyt (PRL + Cyt) for 1 hour ( $n = 3$ ). Scale bar: 25 μm. (F) Apoptosis evaluated by ELISA in chondrocytes incubated in the absence or presence of 100 nM STAT3 inhibitor S31-201 for 24 hours ( $n = 3-4$ ). Bars represent mean ± SEM. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

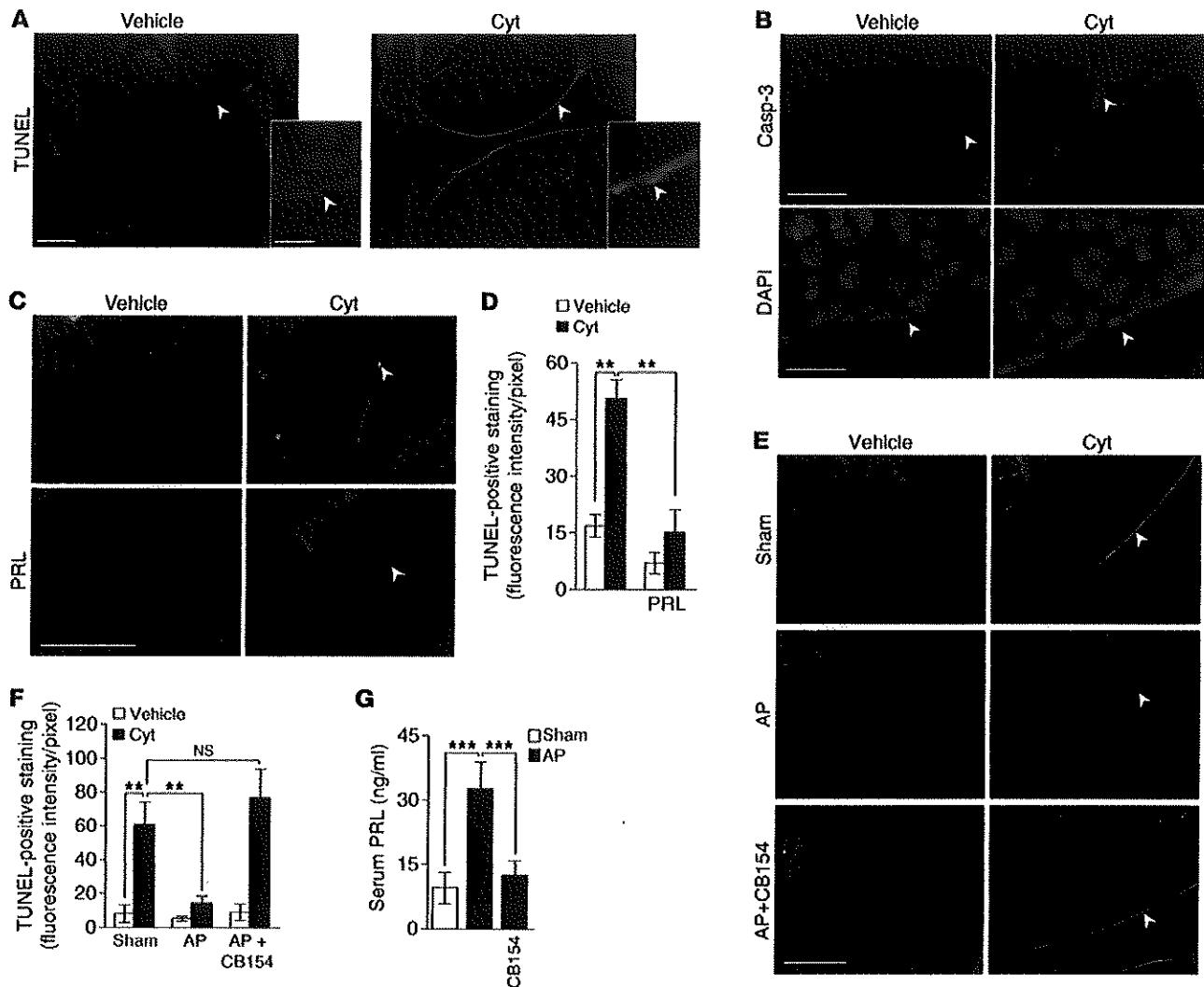
the TUNEL signal (Figure 3, D and F). AP transplants resulted in a significant increase in circulating PRL levels (Figure 3G). These higher PRL levels were responsible for the reduction of Cyt-induced chondrocyte apoptosis, because this reduction was abrogated (Figure 3, E and F) by lowering circulating PRL with CB154 (Figure 3G), a dopamine D2 receptor agonist that inhibits AP PRL release (24). Therefore, intra-articular treatment with PRL or induction of high prolactinemia inhibits Cyt-induced chondrocyte apoptosis.

**Cyt-induced chondrocyte apoptosis is enhanced in PRL receptor-null mice.** In order to explore whether endogenous PRL helps maintain chondrocyte survival under inflammatory conditions, mice null for the PRL receptor (*Prlr*<sup>-/-</sup>) were injected or not with Cyt in one knee and, after 48 hours, both the injected and noninjected knees were evaluated by TUNEL. In the absence of Cyt, there was no apparent histological alteration (data not shown) or positive TUNEL signal in the articular cartilage of *Prlr*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4, A and B), indicating that PRL is not required for the survival of articular chondrocytes under normal conditions. After Cyt treatment, *Prlr*<sup>-/-</sup> mice showed TUNEL staining in the articular cartilage similar to that in wild-type counterparts (Figure 4, A and B). However, in *Prlr*<sup>-/-</sup> mice, but not in *Prlr*<sup>+/+</sup> mice, the noninjected knee, i.e., contralateral to the knee injected with Cyt, also showed a positive TUNEL reaction

(Figure 4, C and D). These findings suggest that normal levels of PRL inhibit the proapoptotic effect of Cyt but that this action is only detected in response to lower levels of Cyt, such as those reaching a knee after contralateral intra-articular injection.

**PRL prevents and reduces chondrocyte apoptosis in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis.** Since PRL protects against Cyt-induced chondrocyte apoptosis, and Cyt can cause apoptosis-mediated cartilage loss in RA (1, 2, 6-9), we investigated whether PRL reduces chondrocyte apoptosis in the adjuvant-induced model of inflammatory arthritis in rats. Osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing haloperidol (Hal), a dopamine D2 receptor antagonist leading to hyperprolactinemia (25), were implanted 3 days before the injection of CFA (Figure 5A). On the day of CFA injection (day 0), infusion of PRL or Hal treatment elevated circulating PRL levels by 7 fold or 8 fold, respectively (Figure 5B). The hyperprolactinemic effect of PRL infusion was maintained and that of Hal decreased with time and resulted, at the end of the experiment (day 21 after CFA) (Figure 5B), in a 6-fold and 2-fold increase in serum PRL, respectively.

Consistent with cartilage destruction being a feature of adjuvant-induced arthritis (26), CFA treatment resulted in chondrocyte apoptosis, as revealed by TUNEL- and active caspase-3-



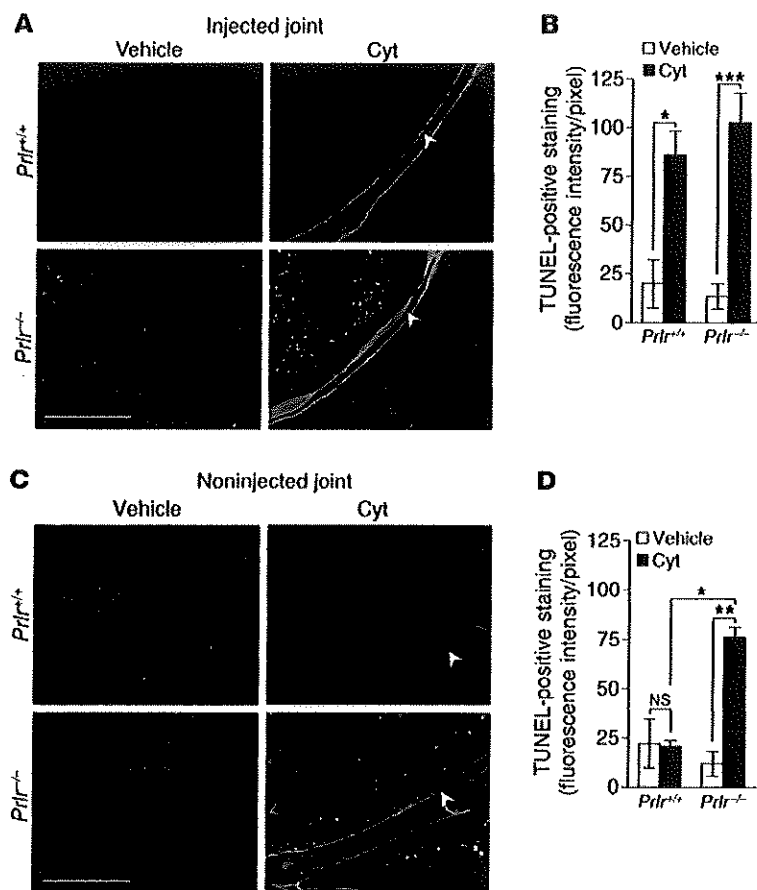
**Figure 3**

PRL inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by the intra-articular injection of Cyt. (A and B) Apoptosis was assessed in rat knees injected with vehicle or Cyt by TUNEL and active caspase-3 staining. The bottom right images in A show enlarged views of knee cartilage. Scale bar: 500  $\mu$ m (top); 25  $\mu$ m (bottom). (B) Nucleic acids in chondrocytes were stained by DAPI. Scale bar: 50  $\mu$ m. (C and D) TUNEL-positive staining and quantification in outer border cartilage of rat knees coinjected with Cyt and PRL ( $n = 4$ ). Scale bar: 100  $\mu$ m. (E and F) TUNEL-positive staining and quantification in outer border cartilages of rat knees from nontransplanted (sham) and AP-transplanted rats exposed to vehicle or Cyt, in the presence or absence of dopamine D2 receptor antagonist, CB154 ( $n = 4-6$ ). (A-C and E) White arrowheads indicate cartilage outer border. Scale bar: 250  $\mu$ m. (G) Serum PRL levels in sham or AP-transplanted rats treated or not with CB154 ( $n = 5-10$ ). Bars represent mean  $\pm$  SEM.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

positive cells in the cartilage of knee joints on day 21 after CFA (Figure 5C), i.e., when joint swelling is at its peak, as seen below. At this time, CFA also produced a significant increase in the mRNA expression of *Casp3*, *Bax*, and *p53* in ankle joints (Figure 5D). Treatment with PRL or Hal lowered CFA-TUNEL and active caspase-3 staining and expression of proapoptotic mediators, indicating that this hormone prevents chondrocyte apoptosis in arthritic joints. We then investigated curative properties of PRL by placing osmotic minipumps delivering PRL 15 days after the injection of CFA (Figure 6A), i.e., when joint swelling is evident, as seen below. On day 21, PRL infusion had elevated serum PRL by 5 fold and 2 fold in control and CFA-treated animals, respectively (Figure 6B). Higher PRL levels correlated with reduced chondrocyte apoptosis

(Figure 6C) and lower expression of proapoptotic mediators (Figure 6D) in the CFA-injected rats. These findings suggest that high prolactinemia prevents and reduces chondrocyte apoptosis in inflammatory arthritis.

*PRL prevents and reduces adjuvant-induced arthritis.* Because PRL has immunoregulatory properties (17), it may also promote cartilage survival in RA by attenuating joint inflammation. Early studies reported that AP-induced hyperprolactinemia reduces CFA-induced arthritis (27) and that Hal chronically suppresses inflammation in patients with RA (28, 29). Here, we show that PRL infusion, initiated 3 days before CFA injection (Figure 7A), delayed the onset and ameliorated the severity of joint inflammation, as indicated by a reduction in hind paw swelling (ankle circumference)



**Figure 4**

Cyt-induced chondrocyte apoptosis is enhanced in *Prlr*<sup>-/-</sup> mice. Apoptosis was assessed by TUNEL staining in knees of *Prlr*<sup>+/+</sup> and *Prlr*<sup>-/-</sup> mice intra-articularly injected or not with Cyt. (A and B) Both injected and (C and D) noninjected knee joints, i.e., ipsilateral and contralateral to the injection site, respectively, were analyzed. White arrowheads indicate cartilage outer border. Scale bar: 250 μm. Bars represent mean ± SEM. (n = 3–5). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

cytokines produced by resident cells and infiltrating inflammatory cells leads to chondrocyte apoptosis and matrix degradation (1, 2, 6–9). Natural chondrocyte survival factors have the potential to be developed for therapeutic application. This study demonstrates for the first time that PRL inhibits cytokine- and arthritis-driven chondrocyte apoptosis. This effect involves the reduced expression of proinflammatory cytokines in joint tissue and the blockage of their proapoptotic effect at the chondrocyte level. Moreover, raising circulating PRL levels reduces joint swelling, pain, pannus formation, and bone erosion in the arthritic joint.

Consistent with previous studies (2, 32, 33), here we show that a combination of TNF-α, IL-1β, and IFN-γ stimulated the in vitro apoptosis of chondrocytes, as evaluated by enhanced mRNA expression of p53, increased BAX/BCL-2 ratio, activated caspase-3, and increased DNA fragmentation. Cyt concentrations were similar to those (1–10 ng/ml) found in synovial fluid of patients with RA with severe disease

(Figure 7, B and C) and the lower mRNA expression of proinflammatory mediators (*Ifng*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa*) in the ankle joint at day 21 after CFA (Figure 7E). Also, Hal treatment 3 days before CFA (Figure 7A) counteracted inflammation even more effectively than PRL infusion. Hal suppressed ankle swelling (Figure 7F) and reduced ankle pain (Figure 7G) and proinflammatory mediator expression (Figure 7H). Consistent with these findings, the histopathological examination of knee sections stained by hematoxylin and eosin showed that PRL infusion, and to a lesser extent Hal treatment, reduced the progression of inflammatory arthritis, as revealed by the absence of pannus formation, and the thinning and destruction of bone trabeculae that occur in normoprolactinemic, adjuvant-injected rats (Figure 8).

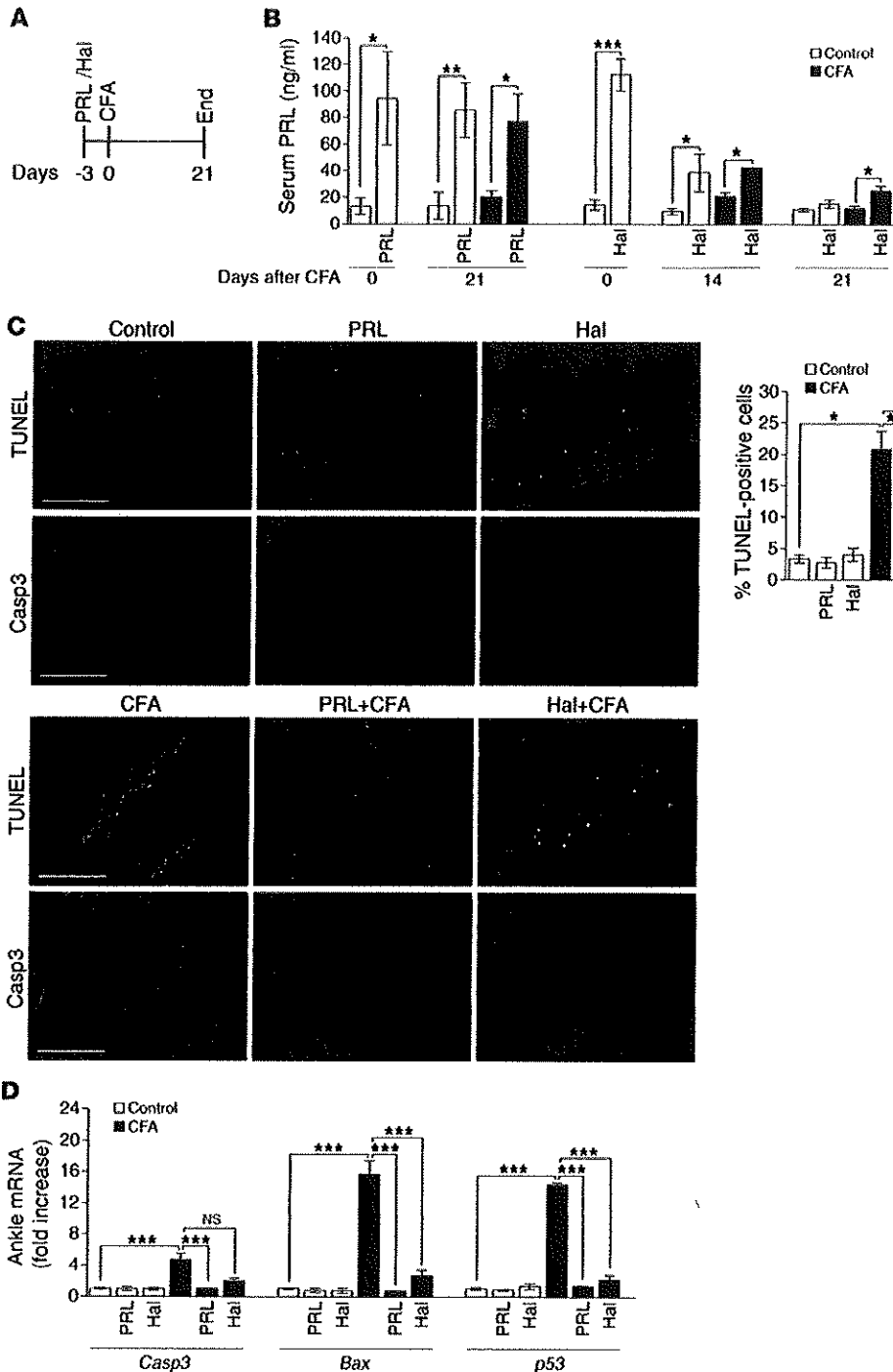
Notably, even when started after inflammatory onset (day 15 after CFA) (Figure 9A), PRL treatment mitigated ankle swelling, pain, and expression of proinflammatory mediators (Figure 9, B–D). These findings support the antiinflammatory action of PRL and its therapeutic value for the prevention and reduction of joint destruction in inflammatory arthritis.

## Discussion

Chondrocytes are responsible for the production and maintenance of the articular cartilage extracellular matrix, which largely determines the biomechanical properties of joints (30). Adult articular cartilage is postmitotic and cannot compensate for loss of chondrocytes occurring in aging (31) and in arthropathies such as osteoarthritis (3) and RA (7). In these diseases, abnormal exposure to

activity (34, 35) or produced by activated chondrocytes (36). PRL opposed the Cyt proapoptotic effect in a dose-dependent manner at concentrations (0.2–2.3 μg/ml) higher than those reported in RA synovial fluid (0.007–0.02 μg/ml) (14, 15) but similar to those (0.2–0.3 μg/ml) circulating in pregnancy and lactation (37). Also, PRL may be higher in cartilage than in synovial fluid due to its local synthesis in chondrocytes (12). Previous findings showed that PRL attenuates the stimulatory effect of Cyt on the expression of iNOS and the production of NO in cultured fibroblasts (38) and NO is a major mediator of Cyt-induced chondrocyte apoptosis (ref. 3 and present data). In chondrocytes, however, PRL did not inhibit Cyt-induced iNOS protein expression/NO production, indicating that its survival effect is independent of NO. On the other hand, PRL activated JAK2 and STAT3, which signal to inhibit chondrocyte apoptosis. STAT3 activation promotes the survival of growth plate chondrocytes by inducing the transcription of BCL-2 (21), and we found that the pharmacological inhibition of STAT3 leads to the apoptosis of articular chondrocytes. It is possible that STAT3-independent, JAK2-dependent mechanisms also contribute to the antiapoptotic effect of PRL. Activation of JAK2 by PRL stimulates PI3K/Akt to promote the survival of various cells (39–42), and activation of Akt inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by endoplasmic reticulum stress or the osteoarthritic condition (43, 44).

The fact that PRL activates molecular mechanisms in chondrocytes to counteract the proapoptotic effect of Cyt argues in favor of its prosurvival effect on cartilage under inflammatory

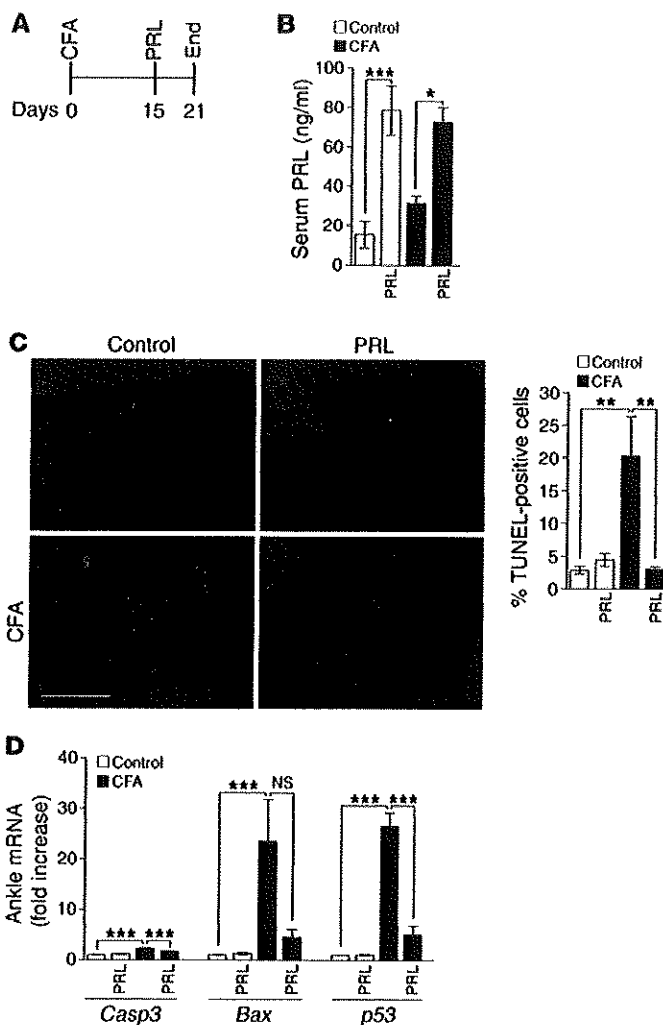


**Figure 5**

PRL and Hal prevent chondrocyte apoptosis in adjuvant-induced arthritis. (A) Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing Hal were placed 3 days before injecting the rats with CFA, and the experiment ended on day 21 after CFA. (B) Serum PRL levels on days 0 and 21 after CFA in PRL-treated rats ( $n = 3-8$ ) and on days 0, 14, and 21 after CFA in Hal-treated rats ( $n = 4-8$ ). (C) TUNEL and active caspase-3 staining of articular cartilage of knees from rats treated or not with PRL or Hal under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . The graph shows the quantification of TUNEL-positive cells in articular cartilage ( $n = 4-8$ ). (D) qRT-PCR-based quantification of *Casp3*, *Bax*, and *p53* mRNA levels in ankle joints from PRL- and Hal-treated rats on day 21 after CFA ( $n = 5-14$ ). Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

conditions. To investigate this concept, we extended the in vitro observations to the articular cartilage in situ. To our knowledge, this is the first report showing that the intra-articular delivery of Cyt induces the apoptosis of chondrocytes. Cyt were used at pharmacological concentrations, since, in contrast to cell-culture conditions, their intra-articular delivery results in a much shorter contact with chondrocytes (45). Apoptosis occurred at the outer surface of articular cartilage, which is the most exposed and susceptible area of the tissue. Superficial articular chondrocytes display higher numbers of IL-1 binding sites than cells in

deep cartilage (46), and enhanced iNOS expression (47) and large numbers of apoptotic chondrocytes have been reported in the superficial and middle zones of osteoarthritic (48) and RA (8) cartilage. Cotreatment with a pharmacological concentration of PRL (60  $\mu\text{g/ml}$ ) or increasing serum PRL to levels similar to those (0.03  $\mu\text{g/ml}$ ) found in the circulation of patients with RA (49) blunted Cyt-induced chondrocyte apoptosis. These findings demonstrate the survival effect of PRL on articular cartilage in vivo and suggest that systemic PRL can enter the joint to protect against chondrocyte apoptosis in RA.



**Figure 6**

PRL reduces chondrocyte apoptosis in already arthritic rats. (A) Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL were placed 15 days after the injection of CFA in rats, and the experiment ended on day 21 after CFA. (B) Serum PRL levels on day 21 after CFA in PRL-treated and nontreated rats ( $n = 4-8$ ). (C) TUNEL and active caspase-3 staining of articular cartilage of knees from rats treated or not with PRL under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . The graph shows the quantification of TUNEL-positive cells in articular cartilage ( $n = 5-8$ ): (D) qRT-PCR-based quantification of *Casp3*, *Bax*, and *p53* mRNA levels in ankle joints from PRL-treated and nontreated rats on day 21 after CFA ( $n = 3-8$ ). Bars represent mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

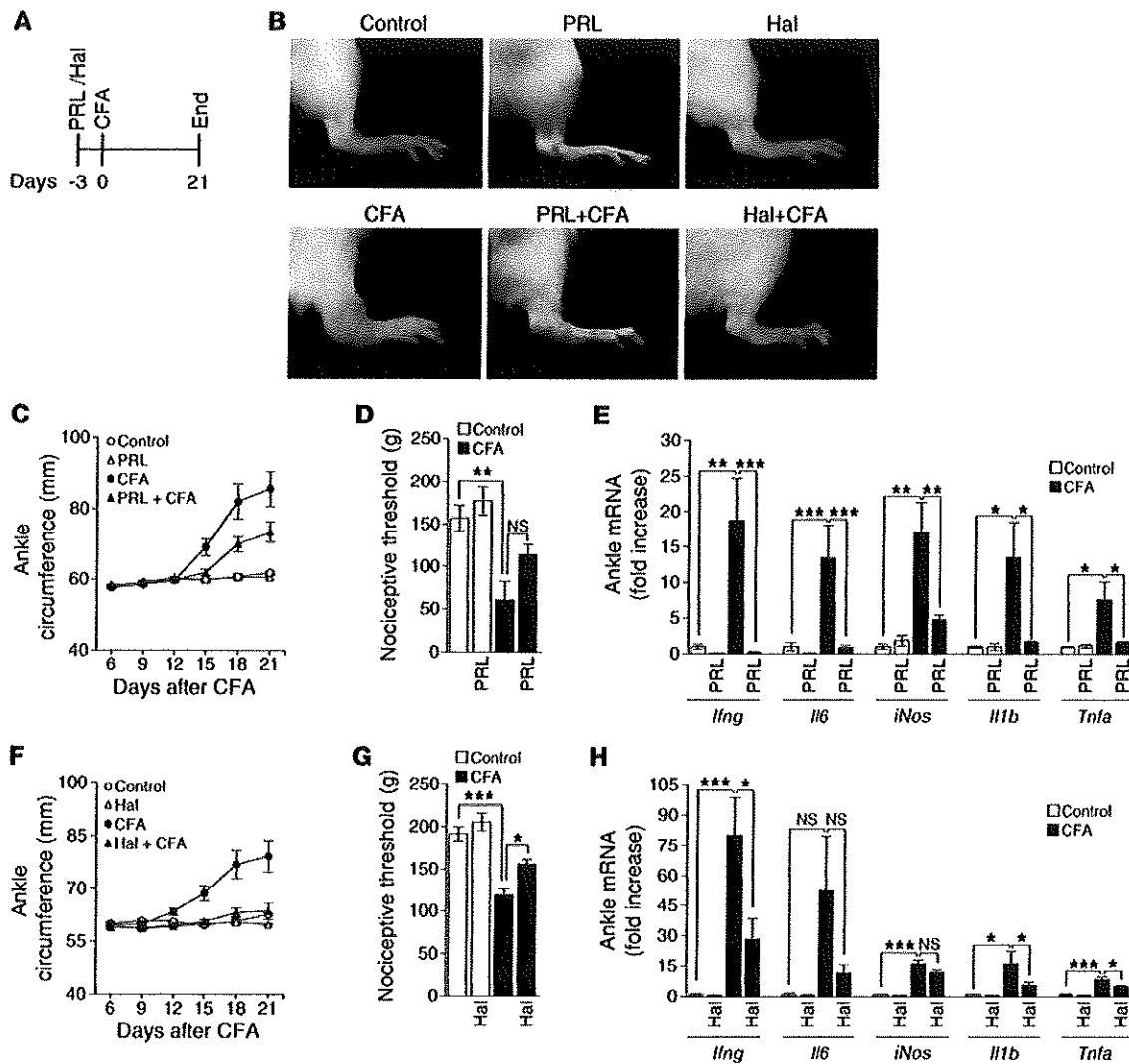
with joint destruction. Increasing prolactinemia, either by PRL infusion or Hal treatment, before or after inducing arthritis, reduced chondrocyte apoptosis and Cyt expression in joints. Also, PRL and Hal ameliorated the severity of arthritis, as evaluated by joint swelling, pain, pannus formation, and bone erosion. The effect of Hal on joint swelling and pain was stronger than that of PRL but weaker on pannus formation and bone erosion. These differences may reflect the fact that, in addition to blocking D2 receptors on the AP, which causes the release of PRL, Hal also blocks dopamine D2 receptors on immune cells, thereby modifying both cytokine release and action (29, 54). Indeed, Cyt are key mediators of CFA-induced arthritis. Their concentration and expression are significantly elevated in serum (26) and joint tissues (present results) of CFA-injected rats, respectively, and IL-1 antagonists and TNF- $\alpha$ -neutralizing antibodies reduce disease severity in these animals (51, 52). We propose that PRL protects against CFA-induced inflammatory arthritis by reducing Cyt levels and counteracting their proapoptotic and proinflammatory actions on synovial cells, cartilage, and bone. However, contrary to these findings, PRL enhances proliferation of cultured RA synovial cells and their release of proinflammatory cytokines and MMP (16). While the in vitro condition may contribute to this discrepancy, in vivo evidence supporting our proposal shows that AP-induced hyperprolactinemia ameliorates CFA-induced inflammation by increasing the circulating levels of corticosterone (23, 27). Because glucocorticoids and inhibitors of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are current treatments for RA (55), sustained PRL administration offers promise for mitigating susceptibility to the onset or flare-up of RA and disease severity, and current medications known to increase prolactinemia constitute therapeutic options in RA, as indicated by clinical studies using Hal (28, 29).

PRL is not essential for cartilage survival under normal conditions. Targeted disruption of the PRL receptor gene has no phenotype in endochondral bone formation (50), a process involving the apoptosis of growth plate chondrocytes, and it causes no apparent alteration indicative of a defect in articular cartilage survival (present study). However, Cyt-induced chondrocyte apoptosis was enhanced in the absence of the PRL receptor, indicating that the survival effect of PRL becomes apparent in the context of inflammation. The fact that in *Prlr*<sup>-/-</sup> mice enhanced apoptosis was also seen in the knee contralateral to the one injected with the Cyt, suggests that the antiapoptotic effect of PRL depends on Cyt levels and thus, that higher values of PRL are needed to promote cartilage survival under highly inflammatory conditions.

Here, we show that increasing systemic PRL levels prevents and reduces chondrocyte apoptosis in CFA-induced arthritis. This model is well documented for the induction of inflammation within joint tissues and for having cartilage and bone destruction similar to that in RA (26, 51). Consistent with a previous study (52), we found that CFA-induced arthritis enhances the expression of apoptotic mediators in joints and showed for the first time that apoptosis occurs in large numbers of articular chondrocytes. Thus, in CFA-induced arthritis as in other models of inflammatory arthritis (53) and in RA (8), chondrocyte apoptosis is associated

The idea of inducing high prolactinemia to help control the progression of joint damage in RA is novel and unexpected. A large body of literature has focused on PRL having a pathogenic role in RA and also in other autoimmune diseases, like SLE, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, celiac disease, MS, etc. Its pathogenic role is largely based on the preponderance of autoimmune diseases in women (56) and on PRL being a sex-linked hormone, on the higher levels of circulating PRL detected in some patients (6%-45%, depending on the disease and specific study), on the therapeutic effects of the dopamine agonist bromocriptine, and on the immunoenhancing properties of PRL (57-61). However, in RA, as in the other autoimmune diseases, treatment with bromocriptine is not always effective and the association between PRL levels



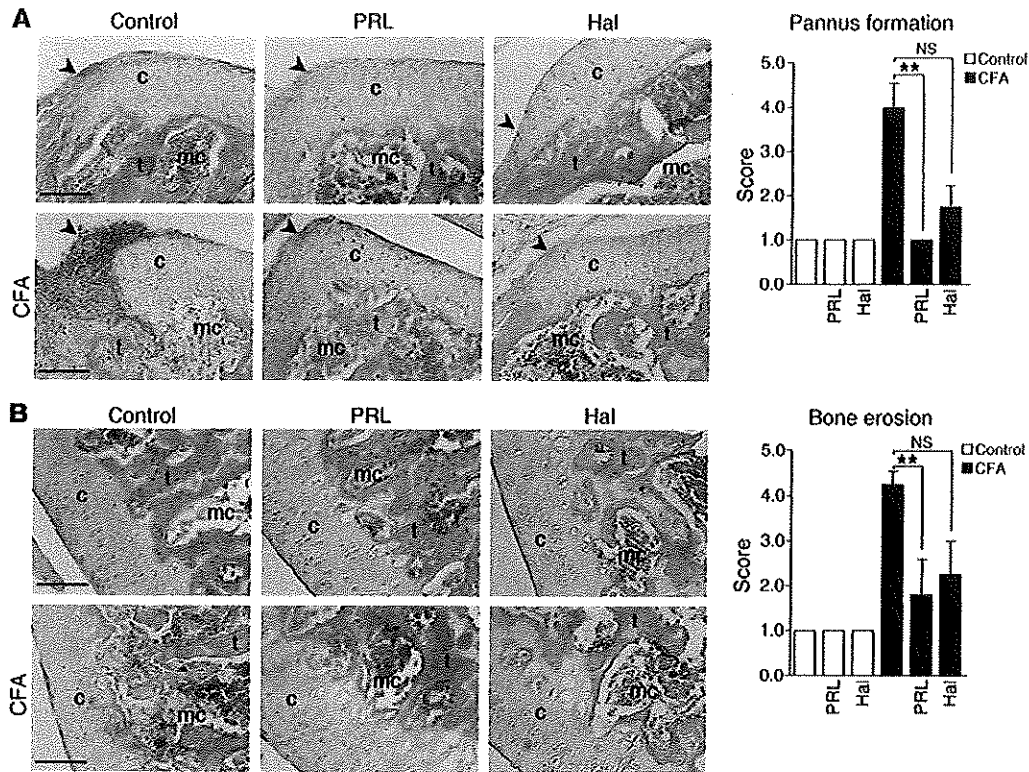


**Figure 7**

PRL and Hal prevent joint inflammation in adjuvant-induced arthritis. (A) Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL or subcutaneous tablets releasing Hal were implanted 3 days before the injection of CFA in rats. (B) Representative photographs of hind paws from groups injected or not with CFA. (C and F) Time course of ankle circumference in groups infused with PRL ( $n = 10$ ) or treated with Hal ( $n = 16$ ) under control and CFA-injected conditions. (C) Days 15, 18, and 21,  $P < 0.001$ , CFA vs. control. Days 18 and 21,  $P < 0.001$ , PRL vs. PRL plus CFA. (F) Days 15 and 18,  $P < 0.001$ , CFA vs. control. Days 12, 15, 18, and 21,  $P < 0.001$ , CFA vs. Hal plus CFA. (D and G) Nociceptive threshold in groups infused with PRL ( $n = 5-9$ ) or treated with Hal ( $n = 5-9$ ). (E and H) qRT-PCR-based quantification of *Il1g*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa* mRNA levels in ankle joints from rats treated with PRL ( $n = 3-10$ ) or with Hal ( $n = 3-10$ ) under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Bars are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

and disease activity has been inconsistent (58-62). Generalizations are confounded by the contribution of PRL synthesized locally by cells like chondrocytes (12), synoviocytes and immune cells (16), and endothelial cells (63), which can potentiate the action of systemic PRL. Moreover, PRL has the ability to exert immunostimulatory or immunosuppressive effects, depending on its level and the pathophysiological conditions (17). For example, physiological concentrations of PRL ( $<0.02 \mu\text{g/ml}$ ) are more effective than high PRL levels ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) in stimulating antibody production by SLE lymphocytes (64), low PRL levels stimulate and high levels inhibit NK cell proliferation (65), and hyperprolactinemic patients (mean serum PRL of  $0.98 \mu\text{g/ml}$  or  $0.20 \mu\text{g/ml}$ ) show reduced NK

cell numbers (66) and function (67). Also, hyperprolactinemia protects against inflammatory arthritis in rats (present study), and treatment with a high, but not a low, dose of PRL exacerbates experimental MS (61). In the latter, however, the low dose of PRL is beneficial when combined with IFN- $\beta$ , and *Prlr*<sup>-/-</sup> mice display a significantly worse outcome than wild-type mice (61). The variability of the relationship between PRL and autoimmune diseases is further highlighted under physiological hyperprolactinemia. During pregnancy, when PRL levels are high, SLE flare-ups occur, but RA and MS go into remission (59, 68). Breastfeeding, a stimulus elevating circulating PRL, exacerbates SLE in humans (69), but it is protective in the B/W mouse model of SLE (70). Breastfeeding also



**Figure 8**

PRL reduces pannus formation and bone erosion in adjuvant-induced arthritis. Histological evaluation of (A) pannus formation and (B) bone erosion in sections of knee joints stained by hematoxylin and eosin from nonimplanted rats (control) or rats implanted with osmotic minipumps delivering PRL or with subcutaneous tablets releasing Hal 3 days before injecting or not injecting CFA; the histological evaluation was carried out on day 21 after CFA ( $n = 3-8$ ). Pannus-associated regions in each group are indicated (arrows). c, cartilage; t, bone trabeculae; mc, bone marrow cavity. Scale bar: 100  $\mu$ m. Graphs show histological scores for (A) pannus formation (synovial membrane hyperplasia and infiltration of leukocytes) and (B) bone erosion (thinning and destruction of bone trabeculae). Values are mean  $\pm$  SEM.  $**P < 0.01$ .

worsens RA (71) but protects against postpartum MS relapse (72). These contrasting observations indicate that PRL exerts opposing influences on immune function that depend on complex immune and hormonal interactions.

Although the role of endogenous PRL in autoimmune diseases has generated controversies (57-62, 73), our study reveals that elevating serum PRL levels significantly attenuates cartilage death and joint inflammation in inflammatory arthritis. This strategy may be comparable to the well-established use of glucocorticoids in patients with RA, in which levels of the endogenous hormones appear insufficient to control the disease (74). While PRL is not essential for normal immune system development and function (75, 76), it is a major stress-related hormone (77), balancing immune system homeostasis in the context of stress, trauma, and inflammation (17, 78). Studies clarifying how circulating and local PRL levels are being regulated in the proinflammatory milieu of pathological situations will help establish appropriate PRL levels for controlling ongoing inflammation and the better use of PRL for therapeutic purposes in RA and other inflammatory-related disorders.

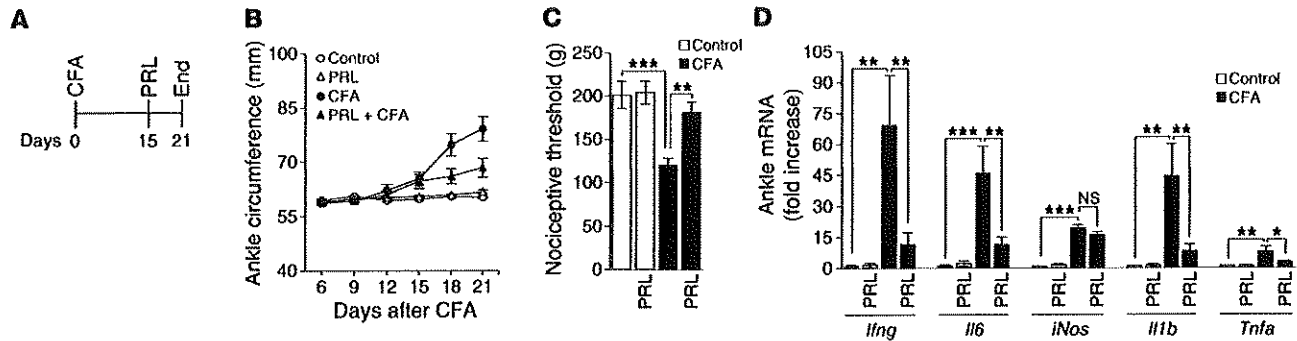
**Methods**

**Reagents.** Recombinant human TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  were purchased from R&D Systems. Rat PRL and rat PRL radioimmunoassay reagents were obtained from A.P. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Los

Angeles, California, USA). Ovine PRL and L-NAME were purchased from Sigma-Aldrich, and the STAT-3 inhibitor S31-201 and anti-BAX (Sc-493) and anti-BCL-2 (Sc-492) antibodies from Santa Cruz Biotechnology Inc. Antibodies anti-caspase-3 (9662) and anti-pJAK2 (Tyr1007/1008, 3771) were from Cell Signaling Technology Inc., anti-iNOS (06-573) was from Upstate, and CFA was from Difco.

**Animals.** Male Lewis and Sprague-Dawley rats (200-250 g), Wistar rats (130-150 g), and *Prlr*<sup>-/-</sup> mice (6-8 months, 129Sv/J background) were housed under standard laboratory conditions (22°C; 12-hour/12-hour light/dark cycle, free access to food and water). Animals were anesthetized with 70% ketamine and 30% xylazine (1  $\mu$ l/g body weight, i.p.) for surgeries and intra-articular injections, and all procedures were performed between 9:00 and 12:00 AM. To avoid stress-induced alterations, animals were handled daily for 7 days before euthanization by carbon dioxide inhalation and decapitation.

**Chondrocyte culture.** Articular chondrocytes were isolated from femoral epiphyseal cartilage of male Wistar rats as described previously (12). Cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells per  $cm^2$  and incubated in DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C for 24 hours. Nonadherent cells were removed, and adherent cells were incubated for 24 hours in either fresh medium or medium containing Cyt (25 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , and 10 ng/ml IFN- $\gamma$ ) combined or not with different concentrations of rat PRL or the NOS inhibitor L-NAME (1 mM). Other cell cultures were incubated with 100 nM of the STAT3 inhibitor, S31-201. All

**Figure 9**

PRL reduces joint inflammation in already arthritic rats. (A) Experimental design diagram: osmotic minipumps delivering PRL were placed 15 days after the injection of CFA in rats, and the experiment ended on day 21 after CFA. (B) Time course of ankle circumference ( $n = 10\text{--}15$ ) (days 18 and 21,  $P < 0.001$ , CFA vs. control), (C) evaluation of ankle joint nociceptive threshold ( $n = 5\text{--}8$ ), and (D) qRT-PCR-based quantification of *Il1g*, *Il6*, *iNos*, *Il1b*, and *Tnfa* mRNA levels ( $n = 5\text{--}8$ ) in ankle joints under control and CFA-injected conditions on day 21 after CFA. Bars are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

experiments were performed in the first passage of culture. Both detached and adherent chondrocytes were assayed for apoptosis by measuring fragmented nucleosomal DNA using the Cell Death Detection ELISA Kit (Roche Diagnostics). To investigate PRL-induced nuclear translocation of STAT3, chondrocytes were seeded on glass coverslips and treated with or without Cyt in the presence or absence of PRL for 1 hour. Cells were then fixed in 4% PFA at room temperature (RT) for 1 hour, washed, incubated 1 hour at RT with 5% normal goat serum in 0.05% Triton-PBS, and then incubated overnight at 4°C with a 1:100 dilution of anti-total STAT3. Cells were then washed and incubated at RT with the second antibody, Alexa Fluor 546 (1:500; Invitrogen), for 2 hours, and their nuclei were counterstained with DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma-Aldrich).

**Western blot.** Chondrocytes incubated with or without Cyt in the absence or presence of PRL were analyzed for JAK2 phosphorylation after 30 minutes, for BAX and BCL-2 after 4 hours, and for total caspase-3 (procaspase-3 and active caspase-3) and iNOS after 6 hours of treatment. Cells were resuspended in lysis buffer (0.5% Igepal, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PMSF, pH 7.0) and subjected to SDS/PAGE, and total protein (40  $\mu\text{g}$ ) was blotted and probed overnight with a 1:1,000 dilution of anti-caspase-3, anti-iNOS, or anti-pJAK2; a 1:300 dilution of anti-BAX; or a 1:200 dilution of anti-BCL-2. Secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) were used. Densitometric analysis was performed using the Quantity One 1-D image analysis software (Bio-Rad Laboratories Inc.).

The Griess colorimetric assay was used to measure the  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations in conditioned media of chondrocytes treated or not with Cyt with or without PRL for 24 hours.

**Intra-articular injection of Cyt.** Lewis rats and *Prlr*<sup>-/-</sup> mice were injected in the articular space of right knee joints with Cyt in a final volume of 60  $\mu\text{l}$  (375 ng TNF- $\alpha$ , 150 ng IL-1 $\beta$ , and 150 ng IFN- $\gamma$ ) and 10  $\mu\text{l}$  (62.5 ng TNF- $\alpha$ , 25 ng IL-1 $\beta$ , and 25 ng IFN- $\gamma$ ), respectively. A group of rats was coinjected with the Cyt and 8  $\mu\text{g}$  rat PRL. As the estimated volume of rat synovial fluid is 130  $\mu\text{l}$ , the intra-articular concentration of PRL was 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Thirteen days before Cyt injection, other groups of rats were implanted with 2 AP grafts under the kidney capsule in order to induce hyperprolactinemia (23), and half of them were injected i.p. with 1.25 mg/d of CB154 (Parlodel, Novartis), starting 5 days before Cyt injection. Endotoxin-free water (60  $\mu\text{l}$  and 10  $\mu\text{l}$  for rats and mice, respectively) was used as a control vehicle. Forty-eight hours after vehicle or Cyt injection, animals were euthanized to evaluate apoptosis in knee cartilage and assess serum PRL levels by radioimmunoassay.

**Adjuvant-induced arthritis.** Sprague-Dawley rats were immunized intradermally at the base of the tail with 0.2 ml CFA (10 mg heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra per 1 ml of Freund's adjuvant). Three days before CFA injection, some rats were rendered hyperprolactinemic by the subcutaneous implantation of a 28-day Alzet osmotic minipump (Alza) containing 1.6 mg ovine PRL or a tablet releasing 35 mg Hal over the 60 days of treatment (Innovative Research of America). Other rats were implanted 15 days after CFA injection with 14-day Alzet osmotic minipumps containing 0.8 mg ovine PRL. Arthritis development was evaluated every 3 days by the hind ankle circumference determined by measuring 2 perpendicular diameters, the laterolateral diameter (*a*) and the anteroposterior diameter (*b*), with a digital caliper and using the following formula: circumference =  $2\pi\sqrt{(a^2+b^2)/2}$ . On day 21 after CFA, hind paw pain was assessed using an Analgesy-Meter (Ugo Basile S.R.L.), and knee joints and hind paws were dissected to evaluate in situ apoptosis and expression of proapoptotic and proinflammatory markers, respectively. In addition, adjuvant-induced arthritis was evaluated histologically. Knee joints were fixed, decalcified, and dehydrated for paraffin embedding. Knee sections (7  $\mu\text{m}$ ) stained by hematoxylin and eosin were scored as reported previously (79), with the following modifications: 1 (no detectable change), 2 (slight change), 3 (moderate change), 4 (remarkable change), and 5 (severe change) for pannus formation (synovial membrane hyperplasia and infiltration of leukocytes) and bone erosion (thinning and destruction of bone trabeculae). Histological parameters were scored by 4 single-blind, independent observers (N. Adán, M.G. Ledesma-Colunga, S. Thebault, and C. Clapp).

**In situ apoptosis.** Seven- $\mu\text{m}$  knee sections were deparaffinized, rehydrated, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate for 7 minutes followed by incubation in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, pH 6.0) for 1 minute at 86°C. Apoptosis was detected by the TUNEL method using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) and by immunohistochemistry using a polyclonal antibody against active caspase-3 (1:25; Millipore) and Alexa Fluor 546 secondary antibody (1:500) as well as by staining the condensed/fragmented DNA with DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma-Aldrich). Apoptotic signals were visualized under fluorescence microscopy (Microscope BX60F5, Olympus Optical Co. LTD) and quantified by the image analysis system software Pro-Plus (Media Cybernetics Inc.).

**qRT-PCR.** Frozen whole ankle joints were pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse



Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR products were detected and quantified with Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) in a 10 µl final reaction volume containing template and 0.5 µM of each of the primer pairs for *Casp3*, forward 5'-GAAAGCCGAAACTCTTCATCA-3', reverse 5'-ATAGTAACCGGGTGC GGAT-3'; *Bax*, forward 5'-ACTGGA-CAACAACATGGTGC-3', reverse 5'-ATCAGCTCGGGCAGCTTTAGT-3'; *p53*, forward 5'-AGAGACCCAGCAACTACCAACA-3', reverse 5'-CTCA-GACTGACAGCCTCTGCAT-3'; *Ifng*, forward 5'-AGCACAAAGCT-GTCAATGAA-3', reverse 5'-TTCTTCTTATTGGGCACACTC-3'; *Il6*, forward 5'-TCCAACTCACTTGAAGCA-3', reverse 5'-TTCATATTGC-CAGTTCTTCG-3'; *Tnfa*, forward 5'-GGGCTTGTCAGTCTGAGTTT-3', reverse 5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'; *iNos*, forward 5'-TTTTAGA-GACGCTTCTGAGG-3', reverse 5'-GTCCCTTTCTCTTTCAGGT-3'; *Il1b*, forward 5'-AAAAGCGTTTGTCTTCAAC-3', reverse 5'-GGAATA-GTGCAGCCATCTTT-3'; and *Ubc*, forward 5'-CTGACAGGGTCCGGC-CATCIT-3', reverse 5'-ACTGCAGCCAACACCGCTGAC-3'. Amplification performed in the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) included a denaturation step of 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of amplification (10 seconds at 95°C, 30 seconds at the primer pair-specific annealing temperature, and 30 seconds at 72°C). The PCR data were analyzed by the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, and cycle thresholds normalized to the housekeeping gene *Ubc* were used to calculate the mRNA levels of interest.

**Serum PRL.** Rat PRL was measured in serum by conventional radioimmunoassay, and infused ovine PRL was measured by the Nb2 cell bioassay, a standard procedure based on the proliferative response of the Nb2 lymphoma cells to PRL, carried out as described previously (80).

**Statistics.** All data were replicated in 3 or more independent experiments. The statistical analyses were performed using the Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc.) and the GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) software. Data distribution and equality of variances were determined by D'Agostino-Pearson omnibus and Levene's tests. In case of data

with normal distribution and/or equal variances, statistical differences between 2 and more than 3 groups were determined by 2-tailed Student's *t* test and 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparison test, respectively. In case of data with nonparametric distribution, statistical differences between 2 and more than 3 groups were determined by Mann Whitney's and Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc comparison tests, respectively. The threshold for significance was set at *P* < 0.05.

**Study approval.** All experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico and comply with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, DC, USA).

### Acknowledgments

The authors thank Gabriel Nava, Martín García, Daniel Mondragón, and Antonio Prado for excellent technical assistance as well as Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript. N. Adán, J. Guzmán-Morales, S.I. Perales-Canales, and M.G. Ledesma-Colunga were supported by fellowships from the Council of Science and Technology of Mexico and the PhD Program in Biomedical Sciences of the National University of Mexico (UNAM). The study was supported by UNAM grants IN200509 and IN200312 to C. Clapp.

Received for publication February 21, 2013, and accepted in revised form June 6, 2013.

Address correspondence to: Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Querétaro, México. Phone: 52.442.238.1028; Fax: 52.442.238.1005; E-mail: clapp@unam.mx.

- McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(6):429-442.
- Schuerwegh AJ, et al. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003; 11(9):681-687.
- Goggs R, et al. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J.* 2003; 166(2):140-158.
- Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2006;6(1):13-19.
- Keffler J, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991;10(13):4025-4031.
- Polzer K, Schett G, Zwerina J. The lonely death: chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis. *Autoimmunity.* 2007;40(4):333-336.
- Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(7):1528-1537.
- Yatsugi N, et al. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci.* 2000;5(2):150-156.
- Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 suppl):S108-S115.
- Lo MY, Kim HT. Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1. *J Orthop Res.* 2004;22(1):140-144.
- Andreas K, et al. Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R9.
- Macotelata Y, et al. Matrix metalloproteinases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci.* 2006;119(pt 9):1790-1800.
- Zermeño C, et al. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol.* 2006;189(2):R1-R8.
- Ogata S, et al. Prolactin is a component of the human synovial fluid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;190(1-2):51-63.
- Rovensky J, et al. Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23(3):292-296.
- Nagafuchi H, et al. 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.
- Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:435-455.
- Wu GJ, et al. Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1520-1531.
- Teixeira CC, et al. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(3):C833-C839.
- DaSilva L, et al. Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR479, TYR515 and TYR580. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;117(2):131-140.
- Suemoto H, et al. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol.* 2007;312(2):572-581.
- Siddiquee K, et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7391-7396.
- Adler RA. The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev.* 1986;7(3):302-313.
- Schuff KG, et al. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest.* 2002; 110(7):973-981.
- Kapur S, et al. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2000;157(4):514-520.
- Cai X, et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2006; 373(2):140-147.
- Neidhart M, Fluckiger BW. Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology.* 1992;77(3):449-455.
- Grimaldi MG. Long-term low dose haloperidol treatment in rheumatoid patients: effects on serum sulphhydryl levels, technetium index, ESR, and clinical response. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12(4):579-581.
- Moots RJ, et al. Old drug, new tricks: haloperidol inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(9):585-587.
- Aigner T, et al. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):128-149.
- Adams CS, Horton WE Jr. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec.* 1998;250(4):418-425.
- Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(12):959-965.



33. Cho TJ, et al. Tumor necrosis factor alpha activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum.* 2003;48(10):2845–2854.
34. Westacott CI, et al. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(9):676–681.
35. Schlaak JF, et al. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(2):155–162.
36. Rohner E, et al. Inflammatory synovial fluid microenvironment drives primary human chondrocytes to actively take part in inflammatory joint diseases. *Immunol Res.* 2012;52(3):169–175.
37. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* 2008;29(1):1–41.
38. Corbacho AM, 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.
39. Hunter S, Koch BL, Anderson SM. Phosphorylation of cbl after stimulation of Nb2 cells with prolactin and its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol.* 1997;11(9):1213–1222.
40. al-Sakkaf KA, Dobson PR, Brown BL. Prolactin induced tyrosine phosphorylation of p59fyn may mediate phosphatidylinositol 3-kinase activation in Nb2 cells. *J Mol Endocrinol.* 1997;19(3):347–350.
41. Bailey JP, et al. Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway. *Mol Endocrinol.* 2004;18(5):1171–1184.
42. Tessier C, et al. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology.* 2001;142(9):4086–4094.
43. Price J, et al. Akt-1 mediates survival of chondrocytes from endoplasmic reticulum-induced stress. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):502–508.
44. Chen Q, et al. Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase C $\alpha$  in chondrocytes. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012;50(1):137–143.
45. van Beuningen HM, Arntz OJ, van den Berg WB. In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum.* 1991;34(5):606–615.
46. Hauselmann HJ, et al. The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):478–488.
47. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998;10(3):263–268.
48. Hashimoto S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(9):1632–1638.
49. Leiderman S, et al. Prolactin and IgG-prolactin complex levels in patients with rheumatic arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:252–257.
50. Clement-Lacroix P, et al. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology.* 1999;140(1):96–105.
51. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(4):377–385.
52. Spears R, et al. Tumour necrosis factor-alpha and apoptosis in the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2003;48(12):825–834.
53. Gonzalez C, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw.* 2007;18(3):127–135.
54. Song C, et al. Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist. *Schizophr Res.* 2000;42(2):157–164.
55. Resman-Targoff BH, Cicero MP. Aggressive treatment of early rheumatoid arthritis: recognizing the window of opportunity and treating to target goals. *Am J Manag Care.* 2010;16(9 suppl):S249–S258.
56. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 1999;283(5406):1277–1278.
57. Neidhart M, Gay RB, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(5–6):218–222.
58. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007;6(8):537–542.
59. Jara LJ, et al. Prolactin and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40(1):50–59.
60. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6–7):A465–A470.
61. Zhornitsky S, et al. Prolactin in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(1):15–23.
62. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 2007;78(suppl 1):255–261.
63. Corbacho AM, et al. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol.* 2000;166(1):53–62.
64. Jacobi AM, et al. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(3):242–247.
65. Matera L, et al. 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.
66. Gerli R, et al. Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clin Exp Immunol.* 1986;64(2):399–406.
67. Vidaller A, et al. Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient. *J Clin Immunol.* 1992;12(3):210–215.
68. Vukusic S, et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMIS study): clinical predictors of postpartum relapse. *Brain.* 2004;127(pt 6):1353–1360.
69. Mok CC, Wong RW, Lau CS. Exacerbation of systemic lupus erythematosus by breast feeding. *Lupus.* 1998;7(8):569–570.
70. McMurray RW, et al. Effects of parturition, suckling and pseudopregnancy on variables of disease activity in the B/W mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1993;20(7):1143–1151.
71. Barrett JH, et al. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1010–1015.
72. Langer-Gould A, et al. Exclusive breastfeeding and the risk of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009;66(8):958–963.
73. McMurray RW. Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;31(1):21–32.
74. Hardy RS, Raza K, Cooper MS. Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13650.
75. Horseman ND, et al. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 1997;16(23):6926–6935.
76. Bouchard B, et al. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol.* 1999;163(2):576–582.
77. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 1990;46(20):1407–1420.
78. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-1, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):292–312.
79. Hamada T, et al. Suppression of adjuvant arthritis of rats by a novel matrix metalloproteinase-inhibitor. *Br J Pharmacol.* 2000;131(8):1513–1520.
80. Tanaka T, et al. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51(5):1058–1063.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA Y LAS VASOINHIBINAS EN LA  
SUPERVIVENCIA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:  
M. C. MARÍA NORMA ADÁN CASTRO**

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

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.  
DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**JURIQUILLA, Querétaro, Méx., Diciembre de 2014**

## Informe Final

El cartílago está constituido por una única población de células denominadas condrocitos, que producen y secretan a la matriz extracelular que las embebe y que determina las propiedades biomecánicas del cartílago. La apoptosis condrocitaria característica de las artropatías inflamatorias como la artritis reumatoide (AR), obedece a la acción de citocinas como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y su inhibición representa una alternativa terapéutica potencial contra dichos padecimientos. En la circulación y el líquido sinovial de pacientes con AR se incrementan frecuentemente los niveles de la hormona prolactina (PRL), que actúa como un factor anti-apoptótico sobre diversos tipos celulares. En este trabajo se demostró que la PRL protege a los condrocitos en cultivos contra la apoptosis inducida por una combinación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  (Cit), y sus efectos son dosis-dependiente e involucran la inhibición de la fragmentación del ADN y la activación de la caspasa-3, así como la prevención del incremento de la expresión de la p53 y del cociente Bax/Bcl2 dependiente de Cit. Las señales mediadoras de la acción condroprotectora de la PRL incluyen a la activación de la vía JAK2/STAT3, que es la vía de señalización clásica de esta hormona, pero no involucran a la inhibición de la vía del óxido nítrico inducida por Cit. Asimismo, se demostró que el incremento en los niveles circulantes de la PRL con minibombas osmóticas de infusión o el tratamiento farmacológico con Haloperidol, contrarresta la muerte de los condrocitos articulares de ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA). Estos resultados evidencian acciones condroprotectoras de la PRL bajo condiciones de inflamación, y la señalan como un factor capaz de favorecer la preservación del cartílago en las artropatías inflamatorias. Por otro lado, dado que la inflamación propicia la activación de proteasas mediadoras del corte proteolítico de la PRL hacia vasoinhibinas (Vi), una familia de péptidos derivados de la hormona y con efecto proapoptótico sobre el cartílago, se evaluó la generación de Vi en condrocitos en cultivo, y la inyección intraarticular de Cit en el ratón carente del receptor para la PRL (rpl<sup>-/-</sup>) indujo la generación de Vi detectables en el suero, sugiriendo que la inflamación induce la muerte condrocitaria no sólo a través de activar mecanismos de apoptosis y degradación de la matriz, sino también a través de eliminar factores de supervivencia natural para los condrocitos. No obstante, dado que la hiperprolactinemia contrarrestó la apoptosis condrocitaria inducida por AIA, se propone que la resultante final de los efectos de la PRL/Vi sobre el cartílago depende de la concentración de la PRL, de la relación PRL/Vi determinada por la presencia de proteasas en el microambiente celular, y de la competencia recíproca entre sus acciones.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd.Mx., a 27 de Abril del 2018

**Dra. Norma Bobadilla Sandoval**  
**Coordinadora de la CINVA**  
**Presente**

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: ""ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LA VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA"" con registro **CINVA: 1490**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

---

Dra. Janette Furuzawa Carballada





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO

26 ABR 2018

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."

1785 13:45

Acuse

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 046-18

**Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda**  
Depto. Inmunología y Reumatología  
Presente.

Estimada Dra. Furuzawa.:

Por este conducto le informo que su proyecto con título "ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA", con registro CINVA IRE-1490-15/16-1 finalizó en marzo 2018. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

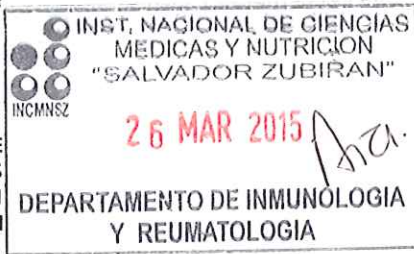
c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Recibí Fidel López Verdugo 26/04/2018



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Acuse

México, D. F., a 25 de Marzo del 2015.

DRA. GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA  
Depto. de Inmunología y Reumatología  
Presente.

REF: CINVA 1490, CLAVE IRE-1490-15/16-1

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**"ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA."**

Este comité ha dictaminado **aprobarlo** a partir de esta fecha.

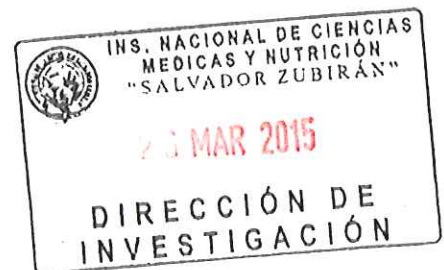
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación  
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F., a 20 de Marzo del 2015

**Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval,**  
Coordinadora de la comisión de Investigación en Animales  
Presente.

REF: CINVA 1490, CLAVE IRE-1490-15/16-1

Estimada Dra. Bobadilla,

En relación a su comunicado del pasado 12 de Marzo, con referencia al Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA**

Le comento el mismo fue modificado de acuerdo a las sugerencias emitidas por la CINVA en los siguientes puntos:

- a) Se recomienda que en el título se especifique la especie en la que se realizará el estudio.
- b) El agua de que maneja en el bioterio es esterilizada por autoclave y por esta razón ya no se acidifica. Corregir esta información.
- c) La disposición de cadáveres no se describió correctamente: "Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar". Los cadáveres se deben colar en bolsa amarilla que tenga la leyenda: "RESIDUOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS". Esta información se debe corregir en el protocolo. Es importante además incluir que los desechos de los animales y los ratones que se sacrifiquen por punto final en el DIEV y que hayan recibido e adenovirus deben colocarse en la bolsa roja y esto debe ser cuidadosamente manejado por el personal del DIEB y debe ser aclarado en el protocolo.
- d) Describir la metodología de cómo se obtendrá el tejido sinovial del fémur/tibia/peroné y se incubará la articulación.
- e) Especificar como se calculó el tamaño de la muestra.
- f) Los investigadores que aparecen en el formato rápido no coinciden con los que aparecen en el protocolo capturado en Latis, favor de homogeneizar la información.
- g) Los animales del DIEB no son libres de patógenos como se especifica en el protocolo. Esto debe corregirse
- h) Se les recuerda que la Norma Oficial específica que para la transportación de los animales, el vehículo debe contar con aire acondicionado.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

- i) El investigador deberá revisar a los ratones diariamente y de ser posible referirse a una escala de dolor conocida como de Melbourne. Esta información debe ser adicionada al protocolo.

**Para ello se anexa el protocolo con los cambios resaltados en verde.**

Finalmente, el DIEB no cuenta con la cantidad de microaisladores necesarios para todos los protocolos que se estén llevando a cabo, por lo que se le sugiere nos brinde su apoyo para la compra de algunos microaisladores, si le es posible.

**A propósito de este punto aprovecho para comentarle que para la realización del proyecto se compraron 24 cajas con sus microaisladores y botellas de agua. Y que de proyectos previos se adquirieron otras 17 cajas con sus correspondientes microaisladores y botellas de agua.**

De antemano le agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

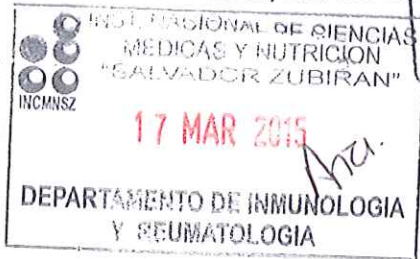
Reciba saludos cordiales.

Atentamente,

Dra. Janette Furuzawa Carballada,  
Depto. de Inmunología y Reumatología.



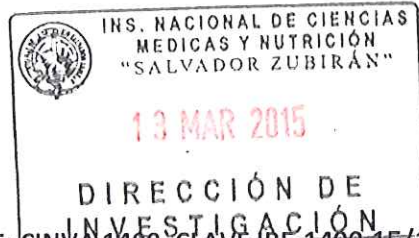
INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



DRA. GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA  
Depto. de Inmunología y Reumatología  
Presente.



México, D. F., a 12 de Marzo del 2015.



REF: CINVA-1490, CLAVE IRE-1490-15/16-1

Estimada Dra. Furuzawa :

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA.”**

Este comité ha dictaminado **no aprobarlo** con las siguientes observaciones:

- a) Se recomienda que en el título se especifique la especie en la que se realizará el estudio.
- b) El agua que se maneja en el bioterio es esterilizada por autoclave y por esta razón ya no se acidifica. Corregir esta información.
- c) La disposición de cadáveres no se describió correctamente: “Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar”. **Los cadáveres se deben colocar en bolsa amarilla que tenga la leyenda: “RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS”**. Esta información se debe corregir en el protocolo. Es importante además, incluir que los desechos de los animales y los ratones que se sacrifiquen por punto final en el DIEB y que hayan recibido el adenovirus deben colocarse en bolsa roja y esto debe ser cuidadosamente manejado por el personal del DIEB y debe ser aclarado en el protocolo.
- d) Describir la metodología de cómo se obtendrá el tejido sinovial del fémur/tibia/peroné y se incubará la articulación.
- e) Especificar como se calculó el tamaño de la muestra.
- f) Los investigadores que aparecen en el formato rápido no coinciden con los que aparecen en el protocolo capturado en Latis, favor de homogenizar la información.
- g) Los animales del DIEB no son libres de patógenos como se especifica en el protocolo. Esto debe corregirse
- h) Se les recuerda que la Norma Oficial especifica que para la transportación de los animales, el vehículo debe contar con aire acondicionado.



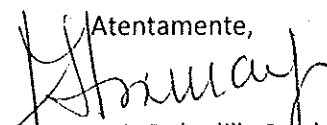
INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

- i) El investigador deberá revisar a los ratones diariamente y de ser posible referirse a una escala de dolor conocida como la escala de Melbourne. Esta información también debe ser adicionada al protocolo.

Finalmente, el DIEB no cuenta con la cantidad de microaisladores necesarios para todos los protocolos que se están llevando a cabo, por lo que se le sugiere nos brinde su apoyo para la compra de algunos microaisladores, si le es posible.

Es importante señalar que las correcciones deben hacerse en el Sistema de Latis y enviar la respuesta a cada punto solicitado, tanto en forma impresa como por correo electrónico ([norma.bobadilla@incmnsz.mx](mailto:norma.bobadilla@incmnsz.mx)).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,  
  
Dra. Norma A. Bobadilla Saldoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:

FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:

**ANÁLISIS DE LA GENERACION DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGENICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA**

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Janette Furuzawa Carballeda
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54850766
Correo electrónico	jfuruzawa@gmail.com

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dra. Carmen Clapp	Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230	Dra.	52-442-2381028	clapp@unam.mx
Dra. Norma Adán Castro	Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230	Dra.	52-442-2381028	amron_ac@yahoo.com.mx
Dra. Bibiana Moreno Carranza	Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230	Dra.	52-442-2381028	
TT Fernando López Barrera	Instituto de Neurobiología Universidad Nacional	Técnico Titular	52-442-2381028	



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

	Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230			
--	--	--	--	--

<b>Estudiantes</b>				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Dra. Guadalupe Ledesma Colunga	Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230	Doctorado	52-442-2381028	

<b>Vigencia del Protocolo.</b>			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	Marzo	2015
Fecha tentativa de finalización.	01	Marzo	2016

**PROCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.**

1) Institución en donde se realizará el proyecto.  
 El desarrollo del modelo se llevará a cabo en el INCMNSZ y el resto del estudio en el INB UNAM en Qro.

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

I. Analizar efectos sobre cultivos primarios de sinoviocitos de la PRL y de las vaso inhibinas bajo condiciones de inflamación (exposición a las Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ).

Meta A. Establecer y caracterizar el cultivo primario de sinoviocitos de ratón.

Meta B. Evaluar el efecto de Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.

Meta C. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.

Meta D. Evaluar el efecto de las vaso inhibinas solas o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.

Meta E. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con vaso inhibinas en presencia o ausencia de Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en sinoviocitos.

II. Determinar la actividad y naturaleza de proteasas capaces de generar vaso inhibinas en sinoviocitos y tejidos de la articulación bajo condiciones de inflamación.

Meta A. Evaluar si el tratamiento con Cit promueve la generación de vaso inhibinas a partir de PRL en sinoviocitos en cultivo y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.

Meta B. Evaluar si extractos de la articulación artrítica promueven la generación de vaso inhibinas a partir de PRL y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.





## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

III. Analizar si las vasoinhibinas modifican la angiogénesis, la hiperplasia de la membrana sinovial y la inflamación en ratones con artritis inducida por colágena tipo II (CIA).  
Meta A: Analizar la transducción de vasoinhibinas (Vi) y de la proteína verde fluorescente (GFP; control) por virus adenoasociados tipo 2 recombinantes (AAV2-Vi y AAV2-GFP, respectivamente) tras su inyección intra-articular en ratones de la cepa DBA/1 bajo condiciones control o de artritis (CIA).  
Meta B: Evaluar si la administración intra-articular de AAV2-Vi modifica la hiperplasia, la angiogénesis y la inflamación debida a la CIA.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:  
El diseño del estudio para los objetivos II y III considera dos grupos por experimento y hasta 5 experimentos en total:  
(1) control (3 ratones)  
(2) CIA (3 ratones)

El diseño del estudio para el objetivo III contempla 5 grupos por experimento y hasta 3 experimentos en total:  
(3) control (5 ratones)  
(4) control + AAV2-Vi (5 ratones)  
(5) CIA (5 ratones)  
(6) CIA + AAV2-GFP\* (5 ratones)  
(7) CIA + AAV2-Vi (5 ratones)  
\* GFP (proteína verde fluorescente) se utilizará como control negativo  
Se empleará el menor número de animales por grupo. Por ser un estudio con ratones singénicos se requiere de al menos tres especímenes por grupo.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

**Categoría A**  
Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

**Categoría B.**  
Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

**Categoría C**  
Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

**Categoría D**  
Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

**Categoría E**  
 Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

**El Investigador deberá consultar:**  
[www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

Categoría:	A:	B:	C:	D:	E:
------------	----	----	----	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.  
**Para mayor información el Investigador deberá consultar:**  
<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se emplea en número mínimo de animales por experimento que permite el diseño experimental. Se procura aprovechar cada animal al máximo utilizándolo, cuando es posible, para los diferentes objetivos del proyecto.

6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

El traslado se llevará a cabo en 5 cajas de policarbonato de piso sólido con microaislador (propiedad de la UNAM), en cada caja se transportarán entre 3 a 5 animales. La transportación será terrestre en una camioneta propiedad de la UNAM.

7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratones DBA/101aHsd	32	18-20 g	5-8 semanas	macho
Ratones DBA/101aHsd	6	18-20 g	5-6 semanas	hembra
No. de Grupos experimentales:	5			
No. de animales por grupo:	5-6			
No. TOTAL DE ANIMALES:	28			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.

4 semanas



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.			
Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.	X		
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	2 veces en 4 semanas, vía subcutánea (base de la cola). Administración de vectores virales recombinantes no patogénicos en la articulación una sola vez a los 21 días de iniciado la primera inoculación de adyuvante.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)		X	Adyuvante completo de Freund
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 5-8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100 µg de colágena tipo II de pollo (Sigma-Aldrich) diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM, y emulsificada 1:1 en ACF empleando una esclusa. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante completo de Freund (aceite mineral).

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.				
Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

No aplica

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No aplica

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
  - i. Respiración: normal, laboriosa...
  - ii. Temperatura
  - iii. Temblores
  - iv. Convulsiones
  - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal				X
b) Apariencia				X
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				X
d) Conducta espontánea.				
e) Conducta provocada.				

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

**Criterios de punto final**

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
  1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
  2. Moderada del 10-20%
  3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
  1. 0 si es normal.
  2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
  3. 2 si está afectado
  4. 3 si está muy afectado.



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

**El PUNTO FINAL DEL ESTUDIO** será cuando el animal no pueda mover la extremidad debido a la artritis o cuando el estudio pudiera complicarse de tal forma que se produzca en el animal un sufrimiento innecesario por ejemplo, que deje de comer o beber, que presente automutilación de la parte afectada o bien produzca vocalizaciones. Además se revisará a los ratones dos veces por semana en el sitio de inyección para determinar que no se observe necrosis. Una vez por semana se tomará la temperatura corporal y se pesarán con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

[http://www.cac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate\\_endpoint.pdf](http://www.cac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf)

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

**Cámara de CO<sub>2</sub>**

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
<b>Ratón</b>	<b>Pentobarbital</b> <b>Asfixia con CO<sub>2</sub></b>	<b>210 mg/kg</b>	<b>IV, IP</b>
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

\* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) **No**

b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.

[http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf)

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

**Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar.**



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

  
Dra. Janette Furuzawa-Carballeda

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN</b>  <b>SALVADOR ZUBIRAN</b>  Dirección de Investigación  <b>FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS</b>
--	---

FECHA DE RECEPCIÓN: 04/02/2015

CLAVE: IRE-1490-15/16-1


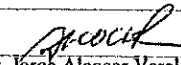
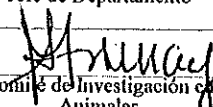
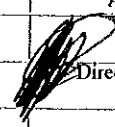
TÍTULO: ANÁLISIS DE LA GENERACION DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGENICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA

INVESTIGADOR RESPONSABLE: FURUZAWA CARBALLEDA GUADALUPE JANETTE

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 02/03/2015 al 31/03/2016

	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
<b>COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN</b>		<b>INSTITUCIONES PARTICIPANTES</b>		
Personal		\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)				
Equipos		\$ 0.00	FIRMAS	
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)				
Materiales		\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			Dra. Janette Furuzawa Carballeda	Dr. Jorge Alcocer Varela
Animales		\$ 0.00	Investigador responsable	Jefe de Departamento
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)				
Estudios		\$ 0.00	Comité de Investigación en Humanos	 Comité de Investigación en Animales
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)				
Viajeros		\$ 0.00	Director de Investigación	 Director General
(reuniones científicas y trabajo de campo)				
Publicaciones		\$ 0.00	Fecha de resolución	
costo directos de publicación, sobregiro)			10-ABRIL-2015	
Suscripciones		\$ 0.00		
(libros, revistas, software, periódicos, etc)				
Varios		\$ 0.00		
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)				
Admon. Gastos pacientes		\$ 0.00		
Fondo de apoyo		\$ 0.00		
(5% de la cantidad total del proyecto)				
<b>Total :</b>		<b>\$ 0.00</b>		

## ANÁLISIS DE LA GENERACION DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGENICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA DE RATONES DBA1/OlaHsd

Dra. Norma Adán Castro<sup>1</sup>, Dra. Janette Furuzawa Carballeda<sup>2</sup> y Dra. Carmen Clapp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230, Tel. 52-442-2381028 e <sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Depto. De inmunología y Reumatología, Vasco de Quiroga No. 15, Col. Sección XVI, CP 14000, México, D.F.

### SÍNTESIS DEL PROYECTO

Hemos demostrado que la administración crónica de la hormona prolactina (PRL), o la inducción farmacológica de hiperprolactinemia, promueve la supervivencia del cartílago y atenúa la inflamación en modelos experimentales de artritis inflamatoria (Adan et al., 2013). También reportamos que células del cartílago (condrocitos) producen metaloproteasas de matriz que procesan a la PRL hacia vasoINHIBINAS, una familia de fragmentos de PRL con acciones inhibitoras de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Macotella et al., 2006). Los efectos antiangiogénicos de las vasoINHIBINAS pudieran reducir la hiperplasia de la membrana sinovial que es dependiente de angiogénesis y que determina la destrucción de la articulación en las artritis inflamatorias. Por lo tanto, la conversión de PRL hacia vasoINHIBINAS podría favorecer los efectos protectores de la PRL en las articulaciones artríticas. De estos hallazgos se desprende la necesidad de conocer mejor los mecanismos responsables de la conversión proteolítica de PRL a vasoINHIBINAS y los efectos de ambos péptidos sobre los tejidos de la articulación para poder establecer la influencia de la PRL en los padecimientos artríticos.

Entre las formas de artritis inflamatoria destaca la artritis reumatoide (AR), una enfermedad sistémica autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones y donde la vascularización de la membrana sinovial sostiene su hiperplasia y transformación hacia un frente inflamatorio ("pannus") que destruye el cartílago y el hueso merced, entre otros factores, a la producción de citocinas proinflamatorias (Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-6, etc.). La demostración de que la PRL regula negativamente la apoptosis del cartílago y la expresión y efecto de las Cit sobre tejidos de la articulación, y que la conversión de PRL hacia vasoINHIBINAS puede tener efectos positivos (inhibición de la vascularización) apoya la pertinencia de estudiar a la PRL y a las vasoINHIBINAS como posibles factores reguladores de la progresión de la AR y otras enfermedades artríticas.

En este proyecto proponemos investigar; (1) si la actividad de MMP capaces de generar vasoINHIBINAS a partir de PRL se regula bajo condiciones de inflamación (exposición *in vitro* a Cit o cuando las células son aisladas de animales artríticos) en cultivos primarios de sinoviocitos obtenidos de animales artríticos y controles; (2) si la PRL y las vasoINHIBINAS regulan la proliferación, supervivencia y expresión de Cit por cultivos primarios de sinoviocitos bajo condiciones normales y de inflamación; (3) el efecto sobre la angiogénesis de la membrana sinovial de la sobre-expresión de vasoINHIBINAS transducidas por virus adenoasociados recombinantes inyectados intra-articularmente en ratones artríticos. La mayor comprensión de los mecanismos responsables de la generación de vasoINHIBINAS y de las acciones de las vasoINHIBINAS sobre la angiogénesis de la articulación artrítica contribuirá a esclarecer la participación de la PRL y sus metabolitos en la fisiopatología de la articulación y su relevancia clínica potencial en el tratamiento de la AR y de otras artropatías inflamatorias.



## ANTECEDENTES

La artritis reumatoide (AR) afecta a un gran número de personas (1% de la población mundial), en su mayor parte mujeres (75%), y suele aparecer entre los 20 y los 45 años de edad (Whitacre et al., 1999). En la AR la autoinmunidad, la infiltración de células inmunocompetentes, la angiogénesis y la hiperplasia de la membrana sinovial conllevan al desarrollo de un frente invasivo o "*pannus*" que destruye el cartilago y el hueso. La hipoxia local derivada de la infiltración y proliferación celular estimula la angiogénesis sinovial vía la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de citocinas proinflamatorias y proangiogénicas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.), que perpetúan la hiperplasia sinovial (Firestein, 2003). Además, las citocinas proinflamatorias destruyen la articulación a través de estimular la apoptosis de los condrocitos (únicas células del cartilago), la degradación de la matriz extracelular del cartilago (McInnes and Schett, 2007; Schuerwegh et al., 2003) y la diferenciación y activación de osteoclastos (Brennan and McInnes, 2008). Estos hallazgos indican la importancia de factores capaces de contrarrestar la inflamación, la angiogénesis y la destrucción de cartilago y del hueso en la prevención y tratamiento de la AR. Entre estos factores se encuentra la hormona prolactina (PRL).

La PRL se identificó por sus efectos sobre la producción de leche durante la lactancia, pero se conoce que tiene muchas otras acciones sobre tipos celulares que incluyen a células de la articulación: células inmunes, condrocitos y osteoblastos. En estas células, el receptor de PRL media efectos directos sobre su supervivencia, diferenciación y producción de mediadores inflamatorios (Bole-Feysot et al., 1998; Yu-Lee, 2002; Zermeno et al., 2006). La asociación de la PRL con la patofisiología de la AR se basa en que este padecimiento es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres (Whitacre et al., 1999) y en que los niveles circulantes de PRL son más altos en las mujeres que en los hombres. Sin embargo, la lactancia, que es una condición de hiperprolactinemia, aumenta la severidad y reduce el riesgo de presentar AR (Barrett et al., 2000; Karlson et al., 2004), no todos los pacientes con AR presentan hiperprolactinemia y no existe una correlación clara entre los niveles sistémicos de PRL y la actividad de la enfermedad (Chuang and Molitch, 2007). Estas inconsistencias pudieran deberse a niveles variables de PRL a lo largo de la AR (Matera et al., 2000) y a la capacidad de la PRL de ejercer efectos proinflamatorios o antiinflamatorios dependiendo del tipo celular, de las condiciones de estrés asociadas al padecimiento (Matera et al., 2000; Yu-Lee, 2002) y del procesamiento proteolítico de la PRL hacia vasoinhibinas (Clapp et al., 2009). Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis específica de la PRL por proteasas que incluyen a las metaloproteasas de matriz (MMP) (Clapp et al., 2009; Macotela et al., 2006). Las vasoinhibinas, pero no la PRL, inhiben la angiogénesis, la vasopermeabilidad y la vasodilatación (Clapp et al., 2009).

Recientemente se obtuvieron evidencias de que la PRL y las vasoinhibinas pueden participar en modular la destrucción del cartilago, la inflamación y la angiogénesis en la articulación artrítica. Se observó que la PRL inhibe la apoptosis del cartilago inducida *in vitro* e *in vivo* por una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Este efecto lo ejerce directamente sobre sus receptores en condrocitos a través de mecanismos independientes del óxido nítrico y dependientes de la vía JAK2/STAT3 (Adan et al., 2013). Además, la PRL protege contra la destrucción del cartilago a través de reducir la expresión de Cit. El tratamiento con PRL o la inducción farmacológica de hiperprolactinemia antes o después de inducir artritis inflamatoria en la rata disminuye la apoptosis de los condrocitos, la expresión de Cit, la formación de *pannus*, la inflamación y el dolor de la articulación (Adan et al., 2013). Estos resultados apoyan el valor preventivo y terapéutico de la PRL en la AR. Además, el haber demostrado el beneficio del haloperidol (una droga de uso clínico por sus efectos antipsicóticos que funciona como antagonista de los receptores D2 de dopamina y, por ende, estimula la secreción hipofisaria de la PRL) provee una estrategia práctica para el tratamiento con PRL (Adan et al., 2013). Sin embargo, también encontramos que la influencia de la PRL sobre la

artritis es más compleja y puede verse modificada por su conversión hacia vasoinhibinas. Los condrocitos producen metaloproteasas de matriz (MMP) que generan vasoinhibinas a partir de PRL (Macotela et al., 2006), las Cit estimulan la producción de MMP (Feldmann et al., 1996) y las vasoinhibinas inhiben la angiogénesis (Clapp et al., 2009; Koch, 2003) y estas acciones podrían proteger contra la artritis a través de reducir la infiltración de células inmunes y la hiperplasia de la membrana sinovial.

## **ANÁLISIS Y PRODUCTOS ESPERADOS**

En este proyecto investigaremos efectos de la PRL y de las vasoinhibinas sobre la supervivencia, proliferación, y expresión de mediadores de inflamación en células aisladas de la membrana sinovial y los mecanismos celulares que median dichas acciones. También evaluaremos la actividad y naturaleza de las proteasas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL en sinoviocitos en cultivo tratados o no con Cit (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) y en tejidos aislados de articulaciones artríticas y normales. Más aún, dado a que la artritis inducida por colágena tipo II (CIA), es el modelo de artritis inflamatoria murina con mayor similitud a la AR humana, se emplearán ratones de la cepa DBA/1 para evaluar el efecto de la sobre-expresión de vasoinhibinas (Vi) transducidas por virus adenoasociados recombinantes (AAV2-Vi) inyectados intra-articularmente.

El trabajo propuesto se traducirá en publicaciones científicas indexadas y en comunicaciones formales en reuniones nacionales e internacionales que permitirán entender mejor el papel de la PRL y su valor terapéutico potencial en la artritis inflamatoria. Además, los resultados obtenidos contribuirán a reforzar una línea de investigación que por más de 20 años se ha centrado en las implicaciones funcionales de la metabolización de la hormona PRL hacia péptidos (vasoinhibinas) con relevancia funcional propia. Finalmente, la obtención de este apoyo permitirá la conclusión satisfactoria del trabajo de tesis de al menos una alumna de doctorado.

## **HIPÓTESIS**

La PRL y las vasoinhibinas ejercen acciones sobre la supervivencia y la proliferación de sinoviocitos y la angiogénesis de la membrana sinovial en la artritis reumatoide experimental. La resultante de estas acciones se ve influida por la actividad de metaloproteasas de matriz (u otras proteasas) que generan vasoinhibinas a partir de PRL.

## **OBJETIVOS**

- I. Analizar efectos sobre cultivos primarios de sinoviocitos de la PRL y de las vasoinhibinas bajo condiciones de inflamación (exposición a las Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ).
  - Meta A. Establecer y caracterizar el cultivo primario de sinoviocitos de ratón.
  - Meta B. Evaluar el efecto de Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta C. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta D. Evaluar el efecto de las vasoinhibinas solas o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta E. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con vasoinhibinas en presencia o ausencia de Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en sinoviocitos.
  
- II. Determinar la actividad y naturaleza de proteasas capaces de generar vasoinhibinas en sinoviocitos y tejidos de la articulación bajo condiciones de inflamación.

Meta A. Evaluar si el tratamiento con Cit promueve la generación de vasoinhibinas a partir de PRL en sinoviocitos en cultivo y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.

Meta B. Evaluar si extractos de la articulación artrítica promueven la generación de vasoinhibinas a partir de PRL y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.

III. Analizar si las vasoinhibinas modifican la angiogénesis, la hiperplasia de la membrana sinovial y la inflamación en ratones con artritis inducida por colágena tipo II (CIA).

Meta A: Analizar la transducción de vasoinhibinas (Vi) y de la proteína verde fluorescente (GFP; control) por virus adenoasociados tipo 2 recombinantes (AAV2-Vi y AAV2-GFP, respectivamente) tras su inyección intra-articular en ratones de la cepa DBA/1 bajo condiciones control o de artritis (CIA).

Meta B: Evaluar si la administración intra-articular de AAV2-Vi modifica la hiperplasia, la angiogénesis y la inflamación debida a la CIA

## **METODOLOGÍA**

Se adquirirán TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , e IFN- $\gamma$  humanas (R&D Systems) y PRL de rata y ratón (Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis, Torrance, CA, EUA). Las vasoinhibinas serán generadas por proteólisis enzimática y mutagénesis dirigida del cDNA de PRL de acuerdo a nuestros métodos (Clapp, 1987; Galfione et al., 2003).

**OBTENCIÓN DEL TEJIDO SINOVIOL DEL FÉMUR/TIBIA/PERONÉ:** La articulación fémur/tibia/peroné completa se disecará bajo la flama del mechero de Bunsen de acuerdo al protocolo de Hardy y colaboradores (Hardy, 2013). En seguida, se removerá cuidadosamente el músculo circundante a la articulación, se seccionará la parte inferior de la patela y los ligamentos que unen al fémur con la tibia para exponer la cavidad articular junto con el tejido sinovial. La articulación abierta (cavidad y tejido sinovial expuesto) se introducirá en un tubo Falcon con capacidad de 50 mL conteniendo 20 mL de medio DMEM con 20% suero fetal bovino y antibióticos, adicionado con 1 mg/mL de colagenasa tipo 4 y 0.1 mg/mL de desoxirribonucleasa y se incubará bajo agitación (300 rpm) durante 3 h a 37° C. Posteriormente, se removerá la articulación y los pequeños fragmentos de tejido remanentes en el tubo se filtrarán a través de una malla de nylon. El medio filtrado conteniendo a las células resultantes de la digestión se centrifugará a 1200 rpm durante 8 min. El paquete celular se resuspenderá en 10 mL de medio fresco y se cultivará a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta un 80% de confluencia para su ensayo.

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE SINOVIOCITOS:** De acuerdo al método descrito (Hardy et al., 2013), se expondrá el tejido sinovial del fémur/tibia/peroné y se incubará la articulación en 20 ml de DMEM suplementado con 20% SFB y antibióticos, conteniendo 1 mg / ml de colagenasa tipo 4 y 0.1 mg/ml de desoxirribonucleasa, con agitación a 300 rpm durante 3 h a 37° C. Los agregados tisulares se filtrarán a través de una malla de nylon; el volumen filtrado se centrifugará a 1200 rpm durante 8 min y el sedimento celular se resuspenderá en 10 ml de medio fresco y se cultivará a 80% de confluencia, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

**EFFECTOS Y VIAS DE SEÑALIZACION ACTIVADAS POR PRL Y VASOINHIBINAS:** Los sinoviocitos serán incubados con PRL (10-100 nM), vasoinhibinas (10-100 nM), con o sin concentraciones variables de Cit (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Se evaluarán efectos sobre apoptosis y proliferación mediante los métodos de ELISA y MTT, respectivamente (Adan et al., 2013; Mosmann, 1983). Posibles efectos de sobre apoptosis se intentarán bloquear en presencia

inhibidores de la activación de NF-KB [BAY 117085 y 10 mM salicilato de sodio (Kutuk and Basaga, 2003; Ni et al., 2001) o de la actividad de las NOS (L-NAME) (Garcia et al., 2008). Lisados celulares tratados por 5, 15, 30 minutos o 24 horas serán analizados por Western blots con anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas o no (según el caso) de JAK2, STAT3, I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X<sub>L</sub>), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X<sub>s</sub>, caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , e IFN- $\gamma$ , IL-6, etc), factores proangiogénicos (VEGF, receptor 2 del VEGF, receptor soluble 1 de VEGF) mediante PCR en tiempo real y las proteínas por Western-blot de acuerdo a protocolos establecidos (Adan et al., 2013).

**ANIMALES:** Todos los experimentos en animales han sido autorizados por el Comité de Ética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, y siguen los requerimientos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (US National Research Council, National Academic Press, Washington, DC).

**ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENA TIPO II (CIA):** Ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100  $\mu$ g de colágena tipo II de pollo (Sigma-Aldrich) diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM, y emulsificada 1:1 en ACF empleando una esclusa. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante completo de Freund (aceite mineral). Los ratones se examinarán cada semana durante 7 semanas a partir de la primera inyección de colágena y se registrará el desarrollo de artritis de acuerdo a la siguiente escala: 1) eritema de dedos, 2) eritema e inflamación de la pata, 3) edema de tobillos, 4) edema e incapacidad de movimiento en toda la extremidad. La evaluación se hará en forma ciega, por un mismo observador.

**TAMAÑO DE MUESTRA.** Por ser un estudio con ratones singénicos, se requiere de al menos tres especímenes por grupo.

**Animales:**

32 ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 5 a 8 semanas de edad.

6 ratones hembra (cepa DBA/101aHsd) de 5 a 8 semanas de edad.

**Grupos:**

GRUPO	TRATAMIENTO	MUESTRA "n"
1.	control	5
2.	AAV2-Vi	5
3.	AAV2-GFP	5
4.	ARTRITIS (CIA)	5
5.	CIA+AAV2-Vi	7
6	CIA+AAV2-GFP	5

En nuestra experiencia 5 es un número mínimo para la detección de diferencias estadísticas confiables (Adán, 2013). En apoyo a esto, estudios en ratones DBA/1 que evalúan la progresión de la artritis inducida por colágena (Zhou, 2006; Takahashi, 2005) bajo terapias que incluyen a las mediadas virus adeno-asociados (Takahashi, 2005) emplean de 6 a 16 animales por grupo experimental. Con base en los trabajos mencionados y nuestra experiencia en modelos in vivo (Adán, 2013) proponemos utilizar inicialmente 5 a 7 animales por grupo. Además este número permitirá obtener el suficiente material para evaluar diversos parámetros clínicos y moleculares.

Así, cada animal será evaluado clínicamente (hinchazón, dolor y pérdida de peso) a lo largo del tiempo y después del sacrificio se aprovecharán al máximo el suero y los tejidos articulares de acuerdo a la Tabla 2 siguiendo la organización indicada en la Tabla 3.

TABLA 2.	
TEJIDO U ÓRGANO	EVALUACIÓN
SANGRE (todos los animales).	a) Marcadores de inflamación sistémica (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CRP, etc.) por ELISA
Membrana sinovial (de rodilla)	a) Cultivo primario de sinoviocitos para analizar efectos de Vi o PRL sobre a expresión (qPCR) de marcadores de inflamación (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc.) y angiogénesis (CD31, factor von Willebrand, VEGF, receptor 2 VEGF).
Rodilla y Tobillo completo	a) Evaluación de la expresión (qPCR) de marcadores de integridad de cartilago y hueso (apoptosis, supervivencia, proliferación celular, erosión ósea) y angiogénesis (CD31, vWF-VIII).
	b) Evaluación histológica de la integridad de cartilago y hueso (apoptosis, supervivencia, proliferación celular, erosión ósea), y angiogénesis (CD31, vWF-VIII).

Además se empleó la siguiente fórmula para el cálculo del tamaño de la muestra. Esta asegura que, si existe una diferencia real, de cierta magnitud, entre dos tratamientos, el experimento tiene

TABLA 3.					
GRUPO	TRATAMIENTO	MUESTRA "n"			Disposición de muestras
1	control	5	x 2 articulaciones	10 articulaciones	3 para Aislamiento de membrana sinovial
					4 para qPCR
					4 para Análisis histológico
2	AAV2-VI	5	x 2 articulaciones	10 articulaciones	3 para Aislamiento de membrana sinovial
					4 para qPCR
					4 para Análisis histológico
3	AAV2-GFP	5	x 2 articulaciones	10 articulaciones	3 para Aislamiento de membrana sinovial
					4 para qPCR
					4 para Análisis histológico
4	ARTRITIS (CIA)	5	x 2 articulaciones	10 articulaciones	3 para Aislamiento de membrana sinovial
					4 para qPCR
					4 para Análisis histológico
5	CIA+AAV2-VI	7	x 2 articulaciones	10 articulaciones	4 para Aislamiento de membrana sinovial
					5 para qPCR
					5 para Análisis histológico
6	CIA+AAV2-GFP	5	x 2 articulaciones	10 articulaciones	3 para Aislamiento de membrana sinovial
					4 para qPCR
					4 para Análisis histológico

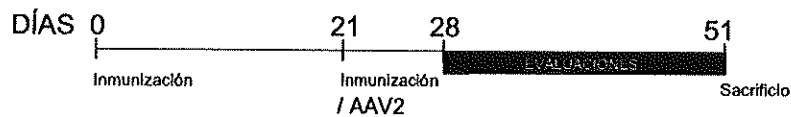
una alta probabilidad (aproximadamente 80%) de detectar si estadísticamente es significativa a un nivel de 5%.

$$n = \frac{16 \times \sigma^2}{d^2}$$

En donde n = número de réplicas por tratamiento  
 $\sigma^2$  = Estimado de la varianza (de la unidad experimental)  
d = diferencia esperada, a detectarse, entre los tratamientos.

Al finalizar el experimento se obtendrá el suero (para analizar niveles de Vi) y las dos articulaciones de las rodillas de cada animal. De cada grupo: 3 rodillas serán evaluadas para angiogénesis por histología y 7 rodillas se someterán a qPCR para evaluar expresión de marcadores de angiogénesis (CD31, VEGF, Factor VonWillebrand), Vi, y factores de inflamación. Nota: Por su variabilidad es conveniente incrementar la (n) para el análisis de PCR

#### PROTOCOLO:



Día 0: Primera inmunización: 100  $\mu$ L de emulsión conteniendo 100 ug CII chicken/CFA por ratón

Día 21: Segunda inmunización: 100  $\mu$ L de emulsión conteniendo 100 ug CII chicken/CFA por ratón

Vía de inmunización: Intradérmica en la base de la cola.

Día 21:

Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-Vi sc (stock  $6.7 \times 10^9$  vg/ $\mu$ L): 10  $\mu$ L AAV2 + 5  $\mu$ L vehículo. En total 15  $\mu$ L / rodilla de ratón.

Día 27: Traslado a Querétaro en vehículo con aire acondicionado.

Día 28: Evaluaciones: Hinchazón articular/peso/dolor.

Día 31

Día 34

Día 37

Día 40

Día 43

Día 46

Día 49

Día 51: Última evaluación y sacrificio.

Análisis de angiogénesis en secciones de articulación (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio CD31) y por qPCR (CD31, vWF-VIII). Valoración de la expresión de los AAV2-Vi en la articulación (qPCR)

**MEDICIONES FISIOLÓGICAS.** Durante el transcurso de las 7 semanas que comprende cada experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones, temperatura, peso y tonicidad muscular. El dolor se determinará diariamente por medio de la escala de Melbourne (Cambios de la personalidad, automutilación, agresión, vocalizaciones anormales, lamido, mordisqueo, rascado de la zona con dolor, cambios de apariencia del pelaje, cambios en la postura o deambulación, tensión del abdomen, cambios en el nivel de actividad, disminución de la ingestión de alimento y agua, cambios en la expresión facial, sudoración y/o salivación excesivas, descargas óculonasales, respiración rápida y superficial, etc.).

**ALIMENTACIÓN.** Libre de patógenos, en pellets, *Ad libitum*.

**AGUA.** Esterilizada por autoclave, *Ad libitum*.

**MANIOBRAS CONDUCTUALES.** Ninguna

**MODIFICACIONES AMBIENTALES.** Se emplearán cajas de policarbonato de piso sólido con microaislador. La cama será de álamo estéril, con una densidad poblacional de 2 a 5 ratones por caja, a condiciones de temperatura, humedad y ventilación estándar, iluminación y ciclos de luz/obscuridad normal. Los ratones adquiridos son libres de patógenos. Se tienen cajas, camas, alimento y agua estéril. Además las cajas tienen microaisladores. Todo lo anterior reduce al mínimo las posibilidades de infección por *Mycoplasma arthritidis*.

**RESTRICCIÓN FÍSICA Y EJERCICIO.** Ninguna.

**INMUNIZACIÓN.** Se inyectarán en la base de la cola con 100µg de colágena tipo II emulsificada 1:1 en adyuvante completo de Freund. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena en adyuvante completo. Se empleará para ello jeringas de insulina.

**ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS.** Ninguno.

**INOCULACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS.** Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-Vi sc (stock  $6.7 \times 10^9$  vg/µL): 10µL AAV2 + 5 µL vehículo. En total 15 µL / rodilla de ratón (Será realizado por la Dra. Norma Adán y la M. en C. Guadalupe Ledezma).

**USO DE SUBSTANCIAS PELIGROSAS.** Ninguna.

**RADIACIONES.** Ninguna.

**TRAUMA.** Ninguno.

**CIRUGÍA.** Ninguna.

**OBTENCIÓN DE MUESTRAS.** Sangre y articulación de las patas.

**DISPOSICIÓN DE LOS CADÁVERES.** Los cadáveres se deben colocar en bolsa amarilla que tenga la leyenda: "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS" y se enviarán a incinerar. Los desechos de animales y ratones que se sacrifiquen por punto final en el DIEB y que hayan recibido el adenovirus se colocarán en bolsa roja que tenga la leyenda: "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS".

Todos los animales se mantendrán bajo la norma 062-ZOO-1999.

El PUNTO FINAL DEL ESTUDIO será cuando el animal no pueda mover la extremidad debido a la artritis o cuando el estudio pudiera complicarse de tal forma que se produzca en el animal un sufrimiento innecesario por ejemplo, que deje de comer o beber, que presente automutilación de

la parte afectada o bien produzca vocalizaciones. Además se revisará a los ratones dos veces por semana en el sitio de inyección para determinar que no se observe necrosis. Una vez por semana se tomará la temperatura corporal y se pesarán con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

**EVALUACION HISTOLOGICA Y EXPRESIÓN DE MEDIADORES DE APOPTOSIS, INFLAMACIÓN, ANGIOGENESIS EN LOS ANIMALES ARTRITICOS:** Las articulaciones serán procesadas por histología en parafina y evaluadas para apoptosis (TUNEL e inmunohistoquímica para caspasa-3 activada), hiperplasia de la membrana sinovial y angiogénesis (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio, anti-CD31), y el RNA que codifica para mediadores de apoptosis, inflamación y angiogénesis (VEGF, VEGFR, sFlt-1) aislado, extraído y cuantificado por PCR tiempo real de acuerdo a métodos descritos previamente (Adan et al., 2013).

**TRATAMIENTO CON VASOINHIBINAS:** Para el tratamiento crónico con vasoinhibinas se inyectarán intra-articularmente vectores derivados de adenovirus asociados tipo-2 recombinantes que contienen como transgén a las vasoinhibinas (AAV2-VI), y se utilizarán como control AAV2 que codifican para la proteína verde fluorescente (AAV2-GFP). Estos virus están siendo producidos y probados mediante métodos descritos por (Ramirez et al., 2011). Para su transducción los AAV2 (5  $\mu$ l conteniendo  $2 \times 10^{10}$  de cada vector en 5 $\mu$ l de vehiculo) o su vehiculo (10  $\mu$ l; 10 mM Tris-HCl, 180mM NaCl, pH 7.4) serán inyectados intra-articularmente antes de iniciar la inducción de CIA. Los niveles de expresión y localización de los transgenes en tejidos articulares serán evaluados por RT-PCR o inmunohistoquímica para GFP, respectivamente.

**ANALISIS DE PROTEASAS DE PRL:** De acuerdo al método descrito por nosotros (Macotela et al., 2006), se incubarán 5  $\mu$ g de PRL con  $1 \times 10^6$  sinoviocitos sembrados en 600  $\mu$ l de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF- $\alpha$  (25 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (10 ng/ml), solas o en combinación con 10  $\mu$ M del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas (Macotela et al., 2006). En otros experimentos, lisados (2  $\mu$ g/2 $\mu$ l) y medios condicionados (5  $\mu$ l) de sinoviocitos tratados o no con citocinas serán incubados con 15  $\mu$ l de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7) por 24 h a 37C en presencia o ausencia de inhibidores de MMP (fenantrolina, GM6001, o EDTA). La generación de vasoinhibinas será evaluada por Western blot/densitometría.

## **GRUPO DE TRABAJO E INFRAESTRUCTURA**

### **Instituto de Neurobiología (UNAM)**

El grupo de trabajo que desarrollará el proyecto está constituido por la responsable, investigadora titular C, nivel III del SNI, PRIDE D (C.Clapp) y los siguientes participantes: una investigadora asociada (Bibiana Moreno Carranza), un técnico titular (Fernando López Barrera); dos estudiantes de doctorado (María Norma Adán Castro y María Guadalupe Ledesma Colunga). El grupo cuenta con amplia experiencia conceptual y técnica avalada por 57 publicaciones internacionales arbitradas relacionadas con el tema del proyecto (27 en los últimos 5 años). La metodología a utilizar incluye: manejo de animales y técnicas quirúrgicas, inyecciones intra-articulares, procesamiento histológico de la articulación, aislamiento y cultivo de condrocitos, evaluación de la apoptosis (TUNEL, ELISA), de la expresión de proteínas (PCR tiempo real, Western blots), desarrollo y caracterización de vectores derivados de virus adenoasociados, análisis de la proteólisis de PRL, desarrollo de modelos de artritis (inducidos por la inyección



Intradérmica del adyuvante completo de Freund o por la administración de albúmina metilada), caracterización de mecanismos de señalización (inmunoprecipitación-Western blots y uso de agentes farmacológicos), etc. Además, el laboratorio de la Dra. Clapp cuenta con las instalaciones y equipamiento básico para técnicas quirúrgicas, de cultivo celular, bioquímica de proteínas, histología, biología molecular, etc. El equipo incluye: microscopios (disección, invertido y de epifluorescencia), campanas de flujo laminar y de alta seguridad (virus), incubadores de CO<sub>2</sub>, microtomos (criostato y de parafina), centrifugas (alta velocidad y ultracentrífuga), equipo de electroforesis para proteínas y ácidos nucleicos, sonicador, homogenizador, espectrofotómetro, digitalizador de laminillas, analizador de imágenes, contadores de emisiones beta y gama, termociclador, densitómetro, lector de ELISAS, baño de temperatura controlada, congelador ultrarío, etc. En colaboración con otros laboratorios se tiene acceso a un deionizador de agua, incluidor de parafina, microscopio confocal y electrónico, etc. Se cuenta con los servicios de secuenciación, bioterio, biblioteca y otros servicios de apoyo.

#### **Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.**

El grupo de trabajo que desarrollará el modelo murino está constituido por la responsable, investigadora en Ciencias Médicas C, nivel II del SNI, (J. Furuzawa). El grupo cuenta con experiencia en el desarrollo del modelo (Godina-González S, Furuzawa-Carballeda J, Utrera-Barillas D, Alcocer-Varela J, Terán LM, Vázquez-Del Mercado M, Leal YA, Alvarado-Cabrero I, Velázquez JR. Amoebic monocyte locomotion inhibitory factor peptide ameliorates inflammation in CIA Mouse model by downregulation of cell adhesion, inflammation/chemotaxis, and matrix metalloproteinases genes. *Inflamm Res* 2010;133:106-11. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez P, Galindo-Feria AS, Cruz-Robles D, Soto-Abraham V, Escobar-Hernández S, Aguilar D, Alpizar-Rodríguez D, Férrez-Blando K, Llorente L. Polymerized-Type I Collagen induces Up-Regulation of Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells and Down-Regulation of IL-17-producing CD4+ T cells (Th17) cells in collagen-induced arthritis. *Clin Develop Immunol*, 2012;2012:618608, 11 pages).

#### **REFERENCIAS**

- Adan, N., J. Guzman-Morales, M.G. Ledesma-Colunga, S.I. Perales-Canales, A. Quintanar-Stephano, F. Lopez-Barrera, I. Mendez, B. Moreno-Carranza, J. Triebel, N. Binart, G. Martinez de la Escalera, S. Thebault, and C. Clapp. 2013. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 123:3902-3913.
- Barrett, J.H., P. Brennan, M. Fiddler, and A. Silman. 2000. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 43:1010-1015.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, and P.A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 19:225-268.
- Brennan, F.M., and I.B. McInnes. 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 118:3537-3545.
- Clapp, C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*. 121:2055-2064.
- Clapp, C., S. Thebault, M.C. Jeziorski, and G. Martinez De La Escalera. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*. 89:1177-1215.

- Chuang, E., and M.E. Molitch. 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *Acta Biomed.* 78 Suppl 1:255-261.
- Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology.* 14:397-440.
- Firestein, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423:356-361.
- Galfione, M., W. Luo, J. Kim, D. Hawke, R. Kobayashi, C. Clapp, L.Y. Yu-Lee, and S.H. Lin. 2003. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif.* 28:252-258.
- Garcia, C., J. Aranda, E. Arnold, S. Thebault, Y. Macotela, F. Lopez-Casillas, V. Mendoza, H. Quiroz-Mercado, H.L. Hernandez-Montiel, S.H. Lin, G.M. de la Escalera, and C. Clapp. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *The Journal of clinical investigation.* 118:2291-2300.
- Hardy, R.S., C. Hulso, Y. Liu, S.J. Gasparini, C. Fong-Yee, J. Tu, S. Stoner, P.M. Stewart, K. Raza, M.S. Cooper, M.J. Seibel, and H. Zhou. 2013. Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 15:R24.
- Karlson, E.W., L.A. Mandl, S.E. Hankinson, and F. Grodstein. 2004. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis and rheumatism.* 50:3458-3467.
- Koch, A.E. 2003. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 62 Suppl 2:ii60-67.
- Kutuk, O., and H. Basaga. 2003. Aspirin prevents apoptosis and NF-kappaB activation induced by H2O2 in hela cells. *Free radical research.* 37:1267-1276.
- Macotela, Y., M.B. Aguilar, J. Guzman-Morales, J.C. Rivera, C. Zermeno, F. Lopez-Barrera, G. Nava, C. Lavalle, G. Martinez de la Escalera, and C. Clapp. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci.* 119:1790-1800.
- Matera, L., M. Mori, M. Geuna, S. Buttiglieri, and G. Palestro. 2000. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol.* 109:47-55.
- McInnes, I.B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 7:429-442.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 65:55-63.
- Ni, H., M. Ergin, Q. Huang, J.Z. Qin, H.M. Amin, R.L. Martinez, S. Saeed, K. Barton, and S. Alkan. 2001. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *British journal of haematology.* 115:279-286.
- Ramirez, M., Z.J. Wu, B. Moreno-Carranza, M.C. Jeziorski, E. Arnold, N. Diaz-Lezama, G.M. de la Escalera, P. Colosi, and C. Clapp. 2011. Vasoinhibin Gene Transfer by Adenoassociated Virus Type 2 Protects against VEGF- and Diabetes-Induced Retinal Vasopermeability. *Investigative ophthalmology & visual science.* 52:8944-8950.
- Schuerwegh, A.J., E.J. Dombrecht, W.J. Stevens, J.F. Van Offel, C.H. Bridts, and L.S. De Clerck. 2003. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage.* 11:681-687.
- Takahashi H, Kato K, Miyake K, et al. Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice, *Clinical and experimental rheumatology*, 23 (2005) 455-461.
- Whitacre, C.C., S.C. Reingold, and P.A. O'Looney. 1999. A gender gap in autoimmunity. *Science.* 283:1277-1278.

- Yu-Lee, L.Y. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 57:435-455.
- Zermeno, C., J. Guzman-Morales, Y. Macotela, G. Nava, F. Lopez-Barrera, J.B. Kouri, C. Lavalle, G.M. de la Escalera, and C. Clapp. 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *The Journal of endocrinology.* 189:R1-8.
- Zhou R, Tang W, Ren YX, He PL, Zhang F, et al. (5R)-5-hydroxytryptolide attenuated collagen-induced arthritis in DBA/1 mice via suppressing interferon-gamma production and its related signaling, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318 (2006) 35-44.



*Sistema Postgrado*



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición  
**Salvador Zubirán**

Folio del registro: IRE-1490-15/16-1

Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

**(0) Comentarios**

Título del proyecto:

ANÁLISIS DE LA GENERACION DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGENICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA

Tipo de proyecto:

Investigación Experimental

Antecedentes:

Hemos demostrado que la administración crónica de la hormona prolactina (PRL), o la inducción farmacológica de hiperprolactinemia, promueve la supervivencia del cartilago y atenúa la inflamación en modelos experimentales de artritis inflamatoria (Adan et al., 2013). También reportamos que células del cartilago (condrocitos) producen metaloproteasas de matriz que procesan a la PRL hacia vasoinhbinas, una familia de fragmentos de PRL con acciones inhibitorias de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Macotela et al., 2006). Los efectos antiangiogénicos de las vasoinhbinas pudieran reducir la hiperplasia de la membrana sinovial que es dependiente de angiogénesis y que determina la destrucción de la articulación en las artritis inflamatorias. Por lo tanto, la conversión de PRL hacia vasoinhbinas podría favorecer los efectos protectores de la PRL en las articulaciones artríticas. De estos hallazgos se desprende la necesidad de conocer mejor los mecanismos responsables de la conversión proteolítica de PRL a vasoinhbinas y los efectos de ambos péptidos sobre los tejidos de la

articulación para poder establecer la influencia de la PRL en los padecimientos artríticos.

Entre las formas de artritis inflamatoria destaca la artritis reumatoide (AR), una enfermedad sistémica autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones y donde la vascularización de la membrana sinovial sostiene su hiperplasia y transformación hacia un frente inflamatorio ("pannus") que destruye el cartilago y el hueso merced, entre otros factores, a la producción de citocinas proinflamatorias (Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-6, etc.). La demostración de que la PRL regula negativamente la apoptosis del cartilago y la expresión y efecto de las Cit sobre tejidos de la articulación, y que la conversión de PRL hacia vasoinhíbinas puede tener efectos positivos (inhibición de la vascularización) apoya la pertinencia de estudiar a la PRL y a las vasoinhíbinas como posibles factores reguladores de la progresión de la AR y otras enfermedades artríticas.

En este proyecto proponemos investigar: (1) si la actividad de MMP capaces de generar vasoinhíbinas a partir de PRL se regula bajo condiciones de inflamación (exposición *in vitro* a Cit o cuando las células son aisladas de animales artríticos) en cultivos primarios de sinoviocitos obtenidos de animales artríticos y controles; (2) si la PRL y las vasoinhíbinas regulan la proliferación, supervivencia y expresión de Cit por cultivos primarios de sinoviocitos bajo condiciones normales y de inflamación; (3) el efecto sobre la angiogénesis de la membrana sinovial de la sobre-expresión de vasoinhíbinas transducidas por virus adenos asociados recombinantes inyectados intra-articularmente en ratones artríticos. La mayor comprensión de los mecanismos responsables de la generación de vasoinhíbinas y de las acciones de las vasoinhíbinas sobre la angiogénesis de la articulación artrítica contribuirá a esclarecer la participación de la PRL y sus metabolitos en la fisiopatología de la articulación y su relevancia clínica potencial en el tratamiento de la AR y de otras artropatías inflamatorias.

#### Definición del problema:

La artritis reumatoide (AR) afecta a un gran número de personas (1% de la población mundial), en su mayor parte mujeres (75%), y suele aparecer entre los 20 y los 45 años de edad (Whitacre et al., 1999). En la AR la autoinmunidad, la infiltración de células inmunocompetentes, la angiogénesis y la hiperplasia de la membrana sinovial conllevan al desarrollo de un frente invasivo o "pannus" que destruye el cartilago y el hueso. La hipoxia local derivada de la infiltración y proliferación celular estimula la angiogénesis sinovial vía la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de citocinas proinflamatorias y proangiogénicas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.), que perpetúan la hiperplasia sinovial (Firestein, 2003). Además, las citocinas proinflamatorias destruyen la articulación a través de estimular la apoptosis de los condrocitos (únicas células del cartilago), la degradación de la matriz extracelular del cartilago (McInnes and Schett, 2007; Schuerwegh et al., 2003) y la diferenciación y activación de osteoclastos (Brennan and McInnes, 2008). Estos hallazgos indican la importancia de factores capaces de contrarrestar la inflamación, la angiogénesis y la destrucción de cartilago y del hueso en la prevención y tratamiento de la AR. Entre estos factores se encuentra la hormona prolactina (PRL). Hemos demostrado que la administración crónica de la hormona prolactina (PRL), o la inducción farmacológica de hiperprolactinemia, promueve la supervivencia del cartilago y atenúa la inflamación en modelos experimentales de artritis inflamatoria (Adan et al., 2013). También reportamos que células del cartilago (condrocitos) producen metaloproteasas de matriz que procesan a la PRL hacia vasoinhíbinas, una familia de fragmentos de PRL con acciones inhibitorias de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Macotella et al., 2006). Los efectos antiangiogénicos de las vasoinhíbinas pudieran reducir la hiperplasia de la membrana sinovial que es dependiente de angiogénesis y que determina la destrucción de la articulación en las artritis inflamatorias. Por lo tanto, la conversión de

PRL hacia vasoinhíbinas podría favorecer los efectos protectores de la PRL en las articulaciones artríticas. De estos hallazgos se desprende la necesidad de conocer mejor los mecanismos responsables de la conversión proteolítica de PRL a vasoinhíbinas y los efectos de ambos péptidos sobre los tejidos de la articulación para poder establecer la influencia de la PRL en los padecimientos artríticos.

#### Justificación:

En este proyecto investigaremos efectos de la PRL y de las vasoinhíbinas sobre la supervivencia, proliferación, y expresión de mediadores de inflamación en células aisladas de la membrana sinovial y los mecanismos celulares que median dichas acciones. También evaluaremos la actividad y naturaleza de las proteasas capaces de generar vasoinhíbinas a partir de PRL en sinoviocitos en cultivo tratados o no con Citi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) y en tejidos aislados de articulaciones artríticas y normales. Más aún, dado a que la artritis inducida por colágena tipo II (CIA), es el modelo de artritis inflamatoria murina con mayor similitud a la AR humana, se emplearán ratones de la cepa DBA/1 para evaluar el efecto de la sobre-expresión de vasoinhíbinas (V) transducidas por virus adenoasociados recombinantes (AAV2-V) inyectados intra-articularme.

#### Hipótesis:

La PRL y las vasoinhíbinas ejercen acciones sobre la supervivencia y la proliferación de sinoviocitos y la angiogénesis de la membrana sinovial en la artritis reumatoide experimental. La resultante de estas acciones se ve influida por la actividad de metaloproteasas de matriz (u otras proteasas) que generan vasoinhíbinas a partir de PRL.

Fecha estimada de inicio: 02/03/2015

Fecha estimada de término: 31/03/2016

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?: Si

### Investigadores participantes

#### (0) Comentarios

Investigador Participación

Orden de participación Investigador responsable

<http://132.247.8.83/aisi/reportes/exportarRegistroHTML.php>

Furuzawa Carballeda, Guadalupe Janette	Investigador responsable	1	Sí
CLAPP, CARMEN	Investigador asociado	2	No
Adán Castro, Norma	Investigador asociado	3	No

## Población vulnerable

### (0) Comentarios

Población vulnerable vinculado al protocolo

- Ninguna de las anteriores

Otra población::

## Objetivos

### (0) Comentarios

Objetivo:

1. Analizar efectos sobre cultivos primarios de sinoviocitos de la PRL y de las vasoinhibinas bajo condiciones de inflamación (exposición a las Cit: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ).
  - Meta A. Establecer y caracterizar el cultivo primario de sinoviocitos de ratón.
  - Meta B. Evaluar el efecto de Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta C. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta D. Evaluar el efecto de las vasoinhibinas solas o en combinación con Cit sobre la supervivencia, proliferación y expresión de factores de inflamación en los sinoviocitos.
  - Meta E. Evaluar el efecto de la PRL sola o en combinación con vasoinhibinas en presencia o ausencia de Cit sobre la supervivencia,

proliferación y expresión de factores de inflamación en sinoviocitos.

II. Determinar la actividad y naturaleza de proteasas capaces de generar vasoinhibinas en sinoviocitos y tejidos de la articulación bajo condiciones de inflamación.

Meta A. Evaluar si el tratamiento con Cit promueve la generación de vasoinhibinas a partir de PRL en sinoviocitos en cultivo y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.

Meta B. Evaluar si extractos de la articulación artrítica promueven la generación de vasoinhibinas a partir de PRL y si dicha generación se bloquea en presencia de inhibidores de MMP.

III. Analizar si las vasoinhibinas modifican la angiogénesis, la hiperplasia de la membrana sinovial y la inflamación en ratones con artritis inducida por colágena tipo II (CIA).

Meta A: Analizar la transducción de vasoinhibinas (Vi) y de la proteína verde fluorescente (GFP; control) por virus adenoasociados tipo 2 recombinantes (AAV2-Vi y AAV2-GFP, respectivamente) tras su inyección intra-articular en ratones de la cepa DBA/1 bajo condiciones control o de artritis (CIA).

Meta B: Evaluar si la administración intra-articular de AAV2-Vi modifica la hiperplasia, la angiogénesis y la inflamación debida a la CIA

#### Tipo de objetivo:

Específico (s)

### Metodología: Diseño general

#### (0) Comentarios

#### Metodología gral:

Se adquirirán TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , e IFN- $\gamma$  humanas (R&D Systems) y PRL de rata y ratón (Programa Nacional de Hormonas e Hipótesis, Torrance, CA, EUA). Las vasoinhibinas serán generadas por proteólisis enzimática y mutagénesis dirigida del cDNA de PRL de acuerdo a nuestros métodos (Clapp, 1987; Galifone et al., 2003).

**ANSLAMIENTO Y CULTIVO DE SINOVIOCIITOS:** De acuerdo al método descrito (Hardy et al., 2013), se expondrá el tejido sinovial del fémur/tibia/peroné y se incubará la articulación en 20 ml de DMEM suplementado con 20% SFB y antibióticos, conteniendo 1 mg / ml de colagenasa tipo 4 y 0.1 mg/ml de desoxirribonucleasa, con agitación a 300 rpm durante 3 h a 37° C. Los agregados tisulares se filtrarán a través de una malla de nylon; el volumen filtrado se centrifugará a 1200 rpm durante 8 min y el sedimento celular se resuspenderá en 10 ml de medio fresco y se cultivará a 80% de confluencia, a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>.



**EFFECTOS Y VIAS DE SEÑALIZACION ACTIVADAS POR PRL Y VASOINHIBINAS:** Los sinoviocitos serán incubados con PRL (10-100 nM), vasoinhíbinas (10-100 nM), con o sin concentraciones variables de Cit (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Se evaluarán efectos sobre apoptosis y proliferación mediante los métodos de ELISA y MTT, respectivamente (Adan et al., 2013; Mosmann, 1983). Posibles efectos de sobre apoptosis se intentarán bloquear en presencia inhibidores de la activación de NF- $\kappa$ B [BAY 117085 y 10 mM salicilato de sodio (Kutluk and Basaga, 2003; Ni et al., 2001) o de la actividad de las NOS (L-NAME) (García et al., 2008). Lisados celulares tratados por 5, 15, 30 minutos o 24 horas serán analizados por Western blots con anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas o no (según el caso) de JAK2, STAT3, I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X<sub>L</sub>), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X<sub>s</sub> caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IFN- $\gamma$ , IL-6, etc), factores proangiogénicos (VEGF, receptor 2 del VEGF, receptor soluble 1 de VEGF) mediante PCR en tiempo real y las proteínas por Western-blot de acuerdo a protocolos establecidos (Adan et al., 2013).

**ANIMALES:** Todos los experimentos en animales han sido autorizados por el Comité de Ética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, y siguen los requerimientos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (US National Research Council, National Academic Press, Washington, DC).

**ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENA TIPO II (CIA):** Ratonos macho (cepa DBA/101ahsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100  $\mu$ g de colágena tipo II de pollo (Sigma-Aldrich) diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM, y emulsificada 1:1 en ACF empleando una esclusa. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante completo de Freund (aceite mineral). Los ratones se examinarán cada semana durante 7 semanas a partir de la primera inyección de colágena y se registrará el desarrollo de artritis de acuerdo a la siguiente escala: 1) eritema de dedos, 2) eritema e inflamación de la pata, 3) edema de tobillos, 4) edema e incapacidad de movimiento en toda la extremidad. La evaluación se hará en forma ciega, por un mismo observador.

**TAMAÑO DE MUESTRA.** Por ser un estudio con ratones singénicos, se requiere de al menos tres especímenes por grupo.

#### Animales:

32 ratones macho (cepa DBA/101ahsd) de 5 a 8 semanas de edad.  
6 ratones hembra (cepa DBA/101ahsd) de 5 a 8 semanas de edad.

#### Grupos:

- (1) Control (5 ratones)
- (2) CIA (4 ratones)
- (3) control (5 ratones)
- (4) control + AAV2-VI (5 ratones)
- (5) CIA (5 ratones)
- (6) CIA + AAV2-GFP\* (5 ratones)

## (7) CIA + AAV2-VI (5 ratones)

\* GFP (proteína verde fluorescente) se utilizará como control negativo

Al finalizar el experimento se obtendrá el suero (para analizar niveles de VI) y las dos articulaciones de las rodillas de cada animal. De cada grupo: 3 rodillas serán evaluadas para angiogénesis por histología y 7 rodillas se someterán a qPCR para evaluar expresión de marcadores de angiogénesis (CD31, VEGF, Factor VonWillebrand), VI, y factores de inflamación.

Nota: Por su variabilidad es conveniente incrementar la (n) para el análisis de PCR

## PROTOCOLO:

## DÍAS

0

Día 0: Primera inmunización: 100 µL de emulsión conteniendo 100 µg CII chicken/CFA por ratón

Día 21: Segunda inmunización: 100 µL de emulsión conteniendo 100 µg CII chicken/CFA por ratón

Vía de inmunización: Intradérmica en la base de la cola.

Día 21:

Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-VI sc (stock  $6.7 \times 10^9$  vg/µL): 10 µL AAV2 + 5 µL vehículo. En total 15 µL / rodilla de ratón.

Día 27: Traslado a Querétaro.

Día 28: Evaluaciones: Hinchazón articular/peso/dolor.

Día 31

Día 34

Día 37

Día 40

Día 43

Día 46

Día 49

Día 51: Última evaluación y sacrificio.

Análisis de angiogénesis en secciones de articulación (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio CD31) y por qPCR (CD31, VWF-VIII).  
Valoración de la expresión de los AAV2-VI en la articulación (qPCR)

**MEDICIONES FISIOLÓGICAS.** Durante el transcurso de las 7 semanas que comprende cada experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones, temperatura, peso y tonicidad muscular.

**ALIMENTACIÓN.** Libre de patógenos, en pellets, *Ad libitum*.

**AGUA.** Esterilizada por autoclave y acidificada, *Ad libitum*.

**MANIOBRAS CONDUCTUALES.** Ninguna

**MODIFICACIONES AMBIENTALES.** Se emplearán cajas de polcarbonato de piso sólido con microaislador. La cama será de álamo estéril, con una densidad poblacional de 2 a 5 ratones por caja, a condiciones de temperatura, humedad y ventilación estándar, iluminación y ciclos de luz/oscuridad normal. Los ratones adquiridos son libres de patógenos y se manejarán en estas condiciones. Se tienen cajas, camas, alimento y agua estéril. Además las cajas tienen microaisladores. Todo lo anterior reduce al mínimo las posibilidades de infección por *Mycoplasma arthritidis*.

**RESTRICCIÓN FÍSICA Y EJERCICIO.** Ninguna.

**INMUNIZACIÓN.** Se inyectarán en la base de la cola con 100µg de colágena tipo II emulsificada 1:1 en adyuvante completo de Freund. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena en adyuvante completo. Se empleará para ello jeringas de insulina.

**ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS.** Ninguno.

**INOCULACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS.** Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-VI sc (stock 6.7x10<sup>9</sup> vg/µl): 10µl AAV2 + 5 µl vehículo. En total 15 µl / rodilla de ratón (Será realizado por la Dra. Norma Adán y la M. en C. Guadalupe Ledezma).

**USO DE SUBSTANCIAS PELIGROSAS.** Ninguna.

**RADIACIONES.** Ninguna.

**TRAUMA.** Ninguna.

**CIRUGÍA.** Ninguna.

**OBTENCIÓN DE MUESTRAS.** Sangre y articulación de las patas.

**DISPOSICIÓN DE LOS CADÁVERES.** Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar.

Todos los animales se mantendrán bajo la norma 062-ZOO-1999.

**EL PUNTO FINAL DEL ESTUDIO** será cuando el animal no pueda mover la extremidad debido a la artritis o cuando el estudio pudiera complicarse de tal forma que se produzca en el animal un sufrimiento innecesario por ejemplo, que deje de comer o beber, que presente automutilación de la parte afectada o bien produzca vocalizaciones. Además se revisará a los ratones dos veces por semana en el sitio de inyección para determinar que no se observe necrosis. Una vez por semana se tomará la temperatura corporal y se pesarán con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

**EVALUACION HISTOLOGICA Y EXPRESIÓN DE MEDIADORES DE APOPTOSIS, INFLAMACIÓN, ANGIOGENESIS EN LOS ANIMALES ARTRITICOS.** Las articulaciones serán procesadas por histología en parafina y evaluadas para apoptosis (TUNEL e inmunohistoquímica para caspasa-3 activada), hiperplasia de la membrana sinovial y angiogénesis (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio, anti-CD31), y el RNA que codifica para mediadores de apoptosis, inflamación y angiogénesis (VEGF, VEGFR, sFlt-1) aislado, extraído y cuantificado por PCR tiempo real de acuerdo a métodos descritos previamente (Adán et al. 2013).

**TRATAMIENTO CON VASOINHIBINAS:** Para el tratamiento crónico con vasoINHIBINAS se inyectarán intra-articularmente vectores derivados de adenovirus asociados tipo-2 recombinantes que contienen como transgén a las vasoINHIBINAS (AAV2-VI), y se utilizarán como control AAV2 que codifican para la proteína verde fluorescente (AAV2-GFP). Estos virus están siendo producidos y probados mediante métodos descritos por

(Ramirez et al., 2011). Para su transducción los AAV2 (5 µl conteniendo 2 X 10<sup>10</sup> de cada vector en 5µl de vehículo) o su vehículo (10 µl; 10 mM Tris-HCl, 180mM NaCl, pH 7.4) serán inyectados intra-articularmente antes de iniciar la inducción de CIA. Los niveles de expresión y localización de los transgenes en tejidos articulares serán evaluados por RT-PCR o inmunohistoquímica para GFP, respectivamente.

**ANÁLISIS DE PROTEASAS DE PRL:** De acuerdo al método descrito por nosotros (Macoteia et al., 2006), se incubarán 5 µg de PRL con 1x10<sup>6</sup> sinoviocitos sembrados en 600 µl de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF-α (25 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml) e IFN-γ (10 ng/ml), solos o en combinación con 10 µM del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas (Macoteia et al., 2006). En otros experimentos, lisados (2 µg/2µl) y medios condicionados (5 µl) de sinoviocitos tratados o no con citoquinas serán incubados con 15 µl de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7) por 24 h a 37C en presencia o ausencia de inhibidores de MMP (fenantrolina, GM6001, o EDTA). La generación de vasoinhibinas será evaluada por Western blot/densitometría.

Se adquirirán TNF-α, IL-1β, e IFN-γ humanas (R&D Systems) y PRL de rata y ratón (Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis, Torrance, CA, EUA). Las vasoinhibinas serán generadas por proteólisis enzimática y mutagénesis dirigida del cDNA de PRL de acuerdo a nuestros métodos (Clapp, 1987; Galitone et al., 2003).

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE SINOVIOCITOS:** De acuerdo al método descrito (Hardy et al., 2013), se expondrá el tejido sinovial del fémur/tibia/peroné y se incubará la articulación en 20 ml de DMEM suplementado con 20% SFB y antibióticos, conteniendo 1 mg / ml de colagenasa tipo 4 y 0.1 mg/ml de desoxirribonucleasa, con agitación a 300 rpm durante 3 h a 37° C. Los agregados tisulares se filtrarán a través de una malla de nylon; el volumen filtrado se centrifugará a 1200 rpm durante 8 min y el sedimento celular se resuspenderá en 10 ml de medio fresco y se cultivará a 80% de confluencia, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

**EFFECTOS Y VIAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR PRL Y VASOINHIBINAS:** Los sinoviocitos serán incubados con PRL (10-100 nM), vasoinhibinas (10-100 nM), con o sin concentraciones variables de Cit (TNF-α, IL-1β, IFN-γ). Se evaluarán efectos sobre apoptosis y proliferación mediante los métodos de ELISA y MTT, respectivamente (Adan et al., 2013; Mosmann, 1983). Posibles efectos de sobre apoptosis se intentarán bloquear en presencia inhibidores de la activación de NF-κB [BAY 117085 y 10 mM salicilato de sodio (Kurtuk and Basaga, 2003; Ni et al., 2001) o de la actividad de las NOS (L-NAME) (García et al., 2008). Lisados celulares tratados por 5, 15, 30 minutos o 24 horas serán analizados por Western blots con anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas o no (según el caso) de JAK2, STAT3, IκBα e IκBβ, etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X<sub>L</sub>), pro-apoptóticos (p53, Bcl-2, caspasa-3), citoquinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF-α, IL-1β, e IFN-γ, IL-6, etc), factores proangiogénicos (VEGF, receptor 2 del VEGF, receptor soluble 1 de VEGF) mediante PCR en tiempo real y las proteínas por Western-blot de acuerdo a protocolos establecidos (Adan et al., 2013).

**ANIMALES:** Todos los experimentos en animales han sido autorizados por el Comité de Ética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, y siguen los requerimientos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (US National Research Council, National Academic Press, Washington, DC).

**ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENA TIPO II (CIA):** Ratonas macho (cepa DBA/1OlaHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía

intradérmica en la base de la cola con 100 µg de colágena tipo II de pollo (Sigma-Aldrich) diluida en 20 mL de ácido acético 5 mM, y emulsificada 1:1 en ACF empleando una eschusa. Tres semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena disuelta en adyuvante completo de Freund (aceite mineral). Los ratones se examinarán cada semana durante 7 semanas a partir de la primera inyección de colágena y se registrará el desarrollo de artritis de acuerdo a la siguiente escala: 1) eritema de dedos, 2) eritema e inflamación de la pata, 3) edema de tobillos, 4) edema e incapacidad de movimiento en toda la extremidad. La evaluación se hará en forma ciega, por un mismo observador.

**TAMAÑO DE MUESTRA.** Por ser un estudio con ratones sirgénicos, se requiere de al menos tres especímenes por grupo.

**Animales:**

32 ratones macho (cepa DBA/1OlaHsd) de 5 a 8 semanas de edad.

6 ratones hembra (cepa DBA/1OlaHsd) de 5 a 8 semanas de edad.

**Grupos:**

- (1) Control (5 ratones)
- (2) CIA (4 ratones)
- (3) control (5 ratones)
- (4) control + AAV2-VI (5 ratones)
- (5) CIA (5 ratones)
- (6) CIA + AAV2-GFP\* (5 ratones)
- (7) CIA + AAV2-VI (5 ratones)

\* GFP (proteína verde fluorescente) se utilizará como control negativo

Al finalizar el experimento se obtendrá el suero (para analizar niveles de VI) y las dos articulaciones de las rodillas de cada animal. De cada grupo: 3 rodillas serán evaluadas para angiogénesis por histología y 7 rodillas se someterán a qPCR para evaluar expresión de marcadores de angiogénesis (CD31, VEGF, Factor VonWillebrand), VI, y factores de inflamación.

Nota: Por su variabilidad es conveniente incrementar la (n) para el análisis de PCR

**PROTOCOLO:**

**DÍAS**

**0**

inmunización: 100 µL de emulsión conteniendo 100 µg CII chicken/CFA por ratón

Día 0: Primera

Día 21: Segunda inmunización: 100 µL de emulsión conteniendo 100 µg CII chicken/CFA por ratón

Vía de inmunización: Intradérmica en la base de la cola.

Día 21:

Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-VI sc (stock  $6.7 \times 10^9$  vg/µL): 10µL AAV2 + 5 µL vehículo. En total 15 µL / rodilla de ratón.

Día 27: Traslado a Querétaro.

Día 28: Evaluaciones: Hinchazón articular/peso/dolor.

Día 31

Día 34

Día 37

Día 40

Día 43

Día 46

Día 49

Día 51: Última evaluación y sacrificio.

Análisis de angiogénesis en secciones de articulación (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio CD31) y por qPCR (CD31, vWF-VIII).  
Valoración de la expresión de los AAV2-VI en la articulación (qPCR)

**MEDICIONES FISIOLÓGICAS.** Durante el transcurso de las 7 semanas que comprende cada experimento, se valorará la progresión inflamatoria en cada animal, midiendo el grosor de las 10 articulaciones, temperatura, peso y tonicidad muscular.

**ALIMENTACIÓN.** Libre de patógenos, en pellets, *Ad libitum*.

**AGUA.** Esterilizada por autoclave y acidificada, *Ad libitum*.

**MANIOBRAS CONDUCTUALES.** Ninguna

**MODIFICACIONES AMBIENTALES.** Se emplearán cajas de policarbonato de piso sólido con microaislador. La cama será de álamo estéril, con una densidad poblacional de 2 a 5 ratones por caja, a condiciones de temperatura, humedad y ventilación estándar, iluminación y ciclos de luz/oscuridad normal. Los ratones adquiridos son libres de patógenos y se manejarán en éstas condiciones. Se tienen cajas, camas, alimento y agua estéril. Además las cajas tienen microaisladores. Todo lo anterior reduce al mínimo las posibilidades de infección por *Mycoplasma arthritis*.

**RESTRICCIÓN FÍSICA Y EJERCICIO.** Ninguna.

**INMUNIZACIÓN.** Se inyectarán en la base de la cola con 100µg de colágena tipo II emulsificada 1:1 en adyuvante completo de Freund. Tras semanas después se hará un refuerzo con la misma cantidad de colágena en adyuvante completo. Se empleará para ello jeringas de insulina.  
**ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS.** Ninguno.

INOCULACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS. Inyección intra-articular (en articulaciones de las dos rodillas) de AAV2-VI sc (stock 6.7x10<sup>9</sup> vgl/μL): 10μL AAV2 + 5 μL vehículo. En total 15 μL / rodilla de ratón (Será realizado por la Dra. Norma Adán y la M. en C. Guadalupe Ledezma).

USO DE SUBSTANCIAS PELIGROSAS. Ninguna.

RADIACIONES. Ninguna.

TRAUMA. Ninguno.

CIRUGÍA. Ninguna.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS. Sangre y articulación de las patas. DISPOSICIÓN DE LOS CADÁVERES. Los cadáveres por ser biológicos no infecciosos se separarán en bolsas transparentes y se enviarán a incinerar.

Todos los animales se mantendrán bajo la norma 062-ZOO-1999.

El PUNTO FINAL DEL ESTUDIO será cuando el animal no pueda mover la extremidad debido a la artritis o cuando el estudio pudiera complicarse de tal forma que se produzca en el animal un sufrimiento innecesario por ejemplo, que deje de comer o beber, que presente automutilación de la parte afectada o bien produzca vocalizaciones. Además se revisará a los ratones dos veces por semana en el sitio de inyección para determinar que no se observe necrosis. Una vez por semana se tomara la temperatura corporal y se pesaran con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

**EVALUACION HISTOLOGICA Y EXPRESION DE MEDIADORES DE APOPTOSIS, INFLAMACION, ANGIOGENESIS EN LOS ANIMALES ARTRITICOS.** Las articulaciones serán procesadas por histología en parafina y evaluadas para apoptosis (TUNEL e inmunohistoquímica para caspasa-3 activada), hiperplasia de la membrana sinovial y angiogenesis (inmunohistoquímica para el marcador de endotelio, anti-CD31), y al RNA que codifica para mediadores de apoptosis, inflamación y angiogenesis (VEGF, VEGFR, sFlt-1) aislado, extraído y cuantificado por PCR tiempo real de acuerdo a métodos descritos previamente [\(Adan et al., 2013\)](#).

**TRATAMIENTO CON VASOINHIBINAS:** Para el tratamiento crónico con vasoINHIBINAS se inyectarán Intra-articularmente vectores derivados de adenovirus asociados tipo-2 recombinantes que contienen como transgén a las vasoINHIBINAS (AAV2-VI), y se utilizarán como control AAV2 que codifican para la proteína verde fluorescente (AAV2-GFP). Estos virus están siendo producidos y probados mediante métodos descritos por [\(Ramirez et al., 2011\)](#). Para su transducción los AAV2 (5 μl conteniendo 2 X 10<sup>10</sup> de cada vector en 5μl de vehículo) o su vehículo (10 μL; 10 mM Tris-HCl, 180mM NaCl, pH 7.4) serán inyectados Intra-articularmente antes de iniciar la inducción de CIA. Los niveles de expresión y localización de los transgenes en tejidos articulares serán evaluados por RT-PCR o inmunohistoquímica para GFP, respectivamente.

**ANALISIS DE PROTEASAS DE PRL:** De acuerdo al método descrito por nosotros [\(Macoteia et al., 2006\)](#), se incubarán 5 ug de PRL con 1x10<sup>6</sup> sinoviocitos sembrados en 600 μl de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF-α (25 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml) e IFN-γ (10 ng/ml), solas o en combinación con 10 μM del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas [\(Macoteia et al., 2006\)](#). En otros experimentos, lisados (2 μg/2μl) y medios condicionados (5 μl) de sinoviocitos tratados o no con citoquinas serán incubados con 15 μl de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7) por 24 h a 37C en presencia o ausencia de inhibidores de MMP (fenantrolina, GM6001, o EDTA). La generación de vasoINHIBINAS será evaluada por Western blot/densitometría.

**Metodología: Criterios de selección**

**(0) Comentarios**

Criterios de selección del protocolo: No aplica

**Beneficio (s) del estudio**

**(0) Comentarios**

Beneficio: Posible obtención de un desarrollo tecnológico aplicable al tratamiento de la artritis reumatoide.

Tipo de beneficio:

**Metodología: Desenlace y variables**

**(0) Comentarios**

Metodología de desenlace y variables:

El análisis estadístico se llevará a cabo empleando el programa SigmaStat1 con una ANOVA de una vía y el subanálisis de Holm-Sidak. Los datos serán expresados como promedios  $\pm$  SEM. Los valores de P-menores o iguales a 0.05 serán considerados como significativos.

**Manejo de confidencialidad**



**(0) Comentarios**

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica

**Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto****(0) Comentarios**

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: No aplica

**Riesgo (s) del estudio****(0) Comentarios**

Molestias generadas por el estudio: No aplica

Complicaciones del procedimiento: No aplica

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: No aplica

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: No aplica

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: No aplica

Otro tipo de riesgo: No aplica

Consentimiento informado

(0) Comentarios

Hoja de informe al paciente:

[No aplica.pdf](#)

Carta de consentimiento informado:

[No aplica.pdf](#)

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de investigadores::

[No aplica.pdf](#)

© 2009 Portal INNNSZ Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran Vasco de Quiroga 15, Colonia Seccion XVI, Talpan C.P.14000, Mexico D.F., MEXICO Telefono: (52 55) 5487 0900