



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 Carballeda

Informe Final

El cartilago 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 cartilago. La apoptosis condrocitaria característica de las artropatías inflamatorias como la artritis reumatoide (AR), obedece a la acción de citocinas como la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y el interferón- γ (IFN- γ), 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 β , TNF- α , e IFN- γ (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 cartilago 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 cartilago, 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*^{-/-}) 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 cartilago 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.



Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis

Norma Adán,¹ Jessica Guzmán-Morales,¹ María G. Ledesma-Colunga,¹ Sonia I. Perales-Canales,¹ Andrés Quintanar-Stéphano,² Fernando López-Barrera,¹ Isabel Méndez,¹ Bibiana Moreno-Carranza,¹ Jakob Triebel,^{1,3} Nadine Binart,³ Gonzalo Martínez de la Escalera,¹ Stéphanie Thebault,¹ and Carmen Clapp¹

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México. ²Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. ³INSERM 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- α , IL-1 β , and IFN- γ) 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*^{-/-}) 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- α , IL-1 β , and IFN- γ stimulate both chondrocyte apoptosis and cartilage extracellular matrix degradation, and their inhibition ameliorates joint destruction (1–4). Transgenic mice expressing TNF- α , 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- α , IL-1 β , and IFN- γ (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.

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- α , IL-1 β , and IFN- γ) 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*^{-/-}) 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.



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**

TESIS

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

PRESENTA:

CE

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



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

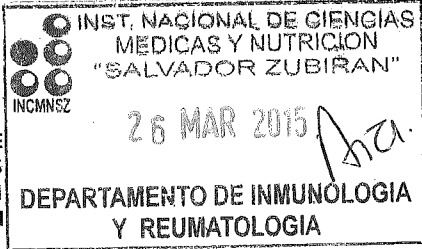
c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

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 JANETTÉ 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:

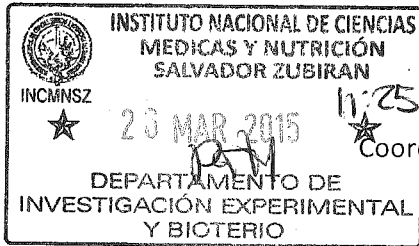
"ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE LAS VASOINHIBINAS Y DE SUS EFECTOS ANTIANGIOGÉNICOS EN LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA."

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

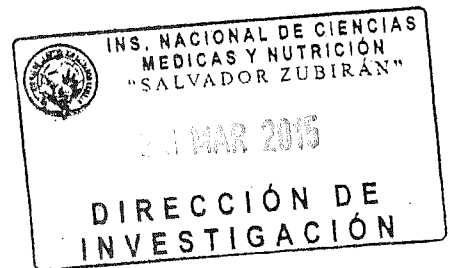
Sin más por el momento quedo de usted.

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



(4922)

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

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 ARTRITICA

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



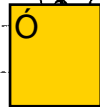

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobregiro)			
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		
15% de la cantidad total del proyecto			
Total :	\$ 0.00		

FIRMAS

 Dra. Janette Furuzawa Carballada Investigador responsable	 Dr. Jorge Alcocer Varela Jefe de Departamento
 Comité de Investigación en Humanos Director de Investigación	 Comité de Investigación en Animales Director General
Fecha de resolución 10-ABRIL-2015	



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 especifica que para la transportación de los animales, el vehículo debe contar con aire acondicionado.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN i)
SALVADOR ZUBIRÁN

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.

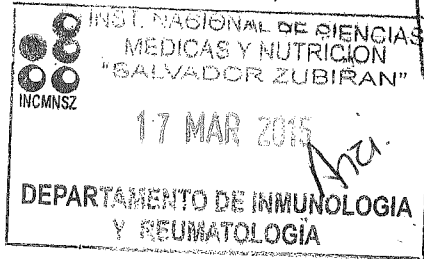
Reciba saludos cordiales.

Atentamente,

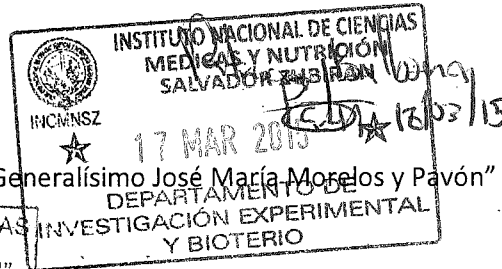
Dra. Janette Furuzawa Carballeda,
Depto. de Inmunología y Reumatología.



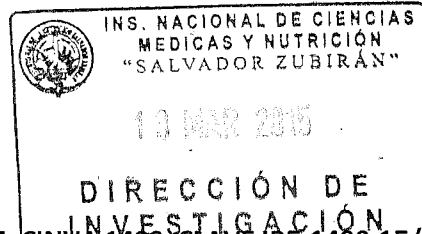
INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



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



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



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 sacrifican 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 específica que para la transportación de los animales, el vehículo debe contar con aire acondicionado.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

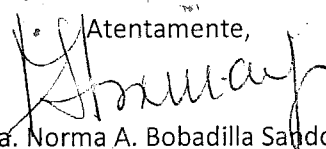
- i) El investigador deberá revisar a los ratones diariamente y de ser posible referirse a una escala de dolor conocida como la escala de Melbourne. Esta información también debe ser adicionada al protocolo.

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).

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, 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 Carballada
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	0 [REDACTED]
Correo electrónico	0 [REDACTED]

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	0 [REDACTED]
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			
--	--	--	--	--

Estudiantes				
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	52-442-2381828	

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	Marzo	2015
Fecha tentativa de finalización.	01	Marzo	2016

PROTOCOLO 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 vasoinhibinas bajo condiciones de inflamación (exposición a las Cit: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ).

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.



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.ccao.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 el 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	5-6 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. Substancial > 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 tomara la temperatura corporal y se pesaran con una balanza electrónica para determinar el grado de la caquexia.

Para mayor información: **Canadian Council on Animal Care**

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

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

Cámara de CO₂

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital- Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejón	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	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/BMBL5_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 Tuzawa-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	

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

2

Dra. Norma Adán Castro¹, Dra. Janette Furuzawa Carballeda² y Dra. Carmen Clapp¹

¹Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230, Tel. 52-442-2381028 e ²Instituto 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 (Adán 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 inhibitorias de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Macotela 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- α , IL-1 β , INF- γ , 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 cartílago 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- α , IL-1 β , 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 cartílago), la degradación de la matriz extracelular del cartílago (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 cartílago 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 cartílago, la inflamación y la angiogénesis en la articulación artrítica. Se observó que la PRL inhibe la apoptosis del cartílago inducida *in vitro* e *in vivo* por una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (Cit: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ). 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 cartílago 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- α , IL-1 β , IFN- γ) 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- α , IL-1 β , IFN- γ).

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- α , IL1- β , 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; Galfione et al., 2003).

OBTENCIÓN DEL TEJIDO SINOVIOL DEL FÉMUR/TIBIA/PERONÉ: La articulación fémur/tibia/peroné completa se diseccionará 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 CO₂ 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 CO₂.

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- α , IL-1 β , 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-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 κ B α e I κ B β , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X_L), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X_s, caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- α , IL1- β , 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): Ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100 μ 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-a, IFN-γ, 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-a, IFN-γ, 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 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
 σ^2 = Estimado de la varianza (de la unidad experimental)
d = diferencia esperada, a detectarse, entre los tratamientos.

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

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

21

28

51

Inmunización

Día 0: Primera inmunización: 100 μ L de emulsión conteniendo 100 μ g CII chicken/CFA por ratón
Día 21: Segunda inmunización: 100 μ L de emulsión conteniendo 100 μ g 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 6.7×10^9 vg/ μ L): 10 μ L AAV2 + 5 μ L vehículo. En total 15 μ 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/oscuridad normal. Los ratones adquiridos no 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 100 μ g 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 6.7×10^9 vg/ μ L): 10 μ L AAV2 + 5 μ L vehículo. En total 15 μ L / 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 revisara 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 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, sFit-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 μ l conteniendo 2×10^{10} de cada vector en 5 μ l de vehículo) o su vehículo (10 μ 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 (Macotella et al., 2006), se incubarán 5 ug de PRL con 1×10^6 sinoviocitos sembrados en 600 μ l de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF- α (25 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IFN- γ (10 ng/ml), solas o en combinación con 10 μ M del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas (Macotella et al., 2006). En otros experimentos, lisados (2 μ g/2 μ l) y medios condicionados (5 μ l) de sinoviocitos tratados o no con citocinas serán incubados con 15 μ l de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl₂, 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 (diseción, invertido y de epifluorescencia), campanas de flujo laminar y de alta seguridad (virus), incubadores de CO₂, 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 ultrafrío, 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. Martínez 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. Martínez 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.
- García, 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.
- Macotella, 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. Martínez, 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. Macotella, 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.

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

CE

Dra. Janette Furuzawa Carballeda² y Dra. Carmen

Clapp¹

¹Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Queretaro, Mexico 76230, Tel. 52-442-2381028 e ²Instituto 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 inhibitorias 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- α , IL-1 β , INF- γ , 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 cartílago 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- α , IL-1 β , 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 cartílago), la degradación de la matriz extracelular del cartílago (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 cartílago 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 cartílago, la inflamación y la angiogénesis en la articulación artrítica. Se observó que la PRL inhibe la apoptosis del cartílago inducida *in vitro* e *in vivo* por una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (Cit: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ). 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 cartílago 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 hipofisiaria 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- α , IL-1 β , IFN- γ) 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- α , IL-1 β , IFN- γ).
 - 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- α , IL1- β , 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; Galfione et al., 2003).

OBTENCIÓN DEL TEJIDO SINOVIOL DEL FÉMUR/TIBIA/PERONÉ: La articulación fémur/tibia/peroné completa se diseccionará 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 CO₂ 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 CO₂.

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- α , IL-1 β , 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-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 κ B α e I κ B β , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X_L), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X_s, caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- α , IL1- β , 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): Ratones macho (cepa DBA/10IaHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100 μ 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 éscusa. 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/10IaHsd) de 5 a 8 semanas de edad.

6 ratones hembra (cepa DBA/10IaHsd) 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- α , IFN- γ , 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- α , IFN- γ , 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

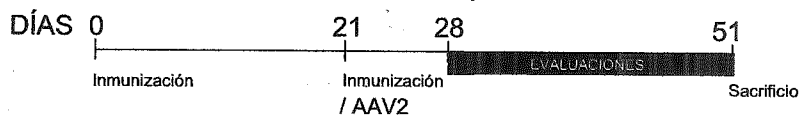
una alta probabilidad (aproximadamente 80%) de detectar si estadísticamente es significativa a un nivel de 5%.

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

En donde n = número de réplicas por tratamiento
 σ^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 μ L de emulsión conteniendo 100 μ g CII chicken/CFA por ratón

Día 21: Segunda inmunización: 100 μ L de emulsión conteniendo 100 μ g 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 6.7×10^9 vg/ μ L): 10 μ L AAV2 + 5 μ L vehículo. En total 15 μ 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 6.7×10^9 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 SUSTANCIAS 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 μ l conteniendo 2×10^{10} de cada vector en 5 μ l de vehículo) o su vehículo (10 μ 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 μ g de PRL con 1×10^6 sinoviocitos sembrados en 600 μ l de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF- α (25 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IFN- γ (10 ng/ml), solas o en combinación con 10 μ M del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas (Macotela et al., 2006). En otros experimentos, lisados (2 μ g/2 μ l) y medios condicionados (5 μ l) de sinoviocitos tratados o no con citocinas serán incubados con 15 μ l de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl₂, 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 CO₂, 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 ultrafrío, 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. Lavalley, 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.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

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 CARBALLÉDA 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

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

FIRMAS

10-ABRIL-2015



LATIS

Sistema Integral



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 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) (Macotela 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- α , IL-1 β , INF- γ , 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.

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 cartílago 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- α , IL-1 β , 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 cartílago), la degradación de la matriz extracelular del cartílago (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 cartílago 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 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) (Macotela 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.

Justificación:

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- α , IL-1 β , IFN- γ) 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.

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.

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

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:

I. Analizar efectos sobre cultivos primarios de sinoviocitos de la PRL y de las vasoinhibinas bajo condiciones de inflamación (exposición a las Cit: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ).

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- α , IL1- β , 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](#); [Galfione 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 CO₂.

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- α , IL-1 β , 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-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 κ B α e I κ B β , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X_L), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X_s, caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- α , IL-1- β , 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): Ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados vía intradérmica en la base de la cola con 100 μ 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 ug CII chicken/CFA por ratón

Día 21: Segunda inmunización: 100 µL 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 6.7×10^9 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/obscuridad 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 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 6.7×10^9 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 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 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, sFit-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 μ l conteniendo 2×10^{10} de cada vector en 5 μ l de vehículo) o su vehículo (10 μ 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.

ANÁLISIS DE PROTEASAS DE PRL: De acuerdo al método descrito por nosotros (Macotela et al., 2006), se incubarán 5 μ g de PRL con 1×10^6 sinoviocitos sembrados en 600 μ l de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF- α (25 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IFN- γ (10 ng/ml), solas o en combinación con 10 μ M del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas (Macotela et al., 2006). En otros experimentos, lisados (2 μ g/2 μ l) y medios condicionados (5 μ l) de sinoviocitos tratados o no con citocinas serán incubados con 15 μ l de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl₂, 0.15 M NaCl, pH 7) por 24 h a 37°C 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-1 β , 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; Galfione et al., 2003).

ASLAMIENTO 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 CO₂.

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-1 β , 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-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 κ B α e I κ B β , etc. Se evaluará la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Pim-1 y Bcl-X_L), pro-apoptóticos (p53, Bcl-X_s, caspasa-3), citocinas o factores inflamatorios (iNOS, TNF- α , IL-1 β , 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): Ratones macho (cepa DBA/101aHsd) de 8 semanas de edad serán inmunizados via

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). 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 ug CII chicken/CFA por ratón

Día 21: Segunda inmunización: 100 µL 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 6.7×10^9 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/obscuridad 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 6.7×10^9 vg/ μ L): 10 μ L AAV2 + 5 μ L vehículo. En total 15 μ L / 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 revisara 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 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 μ l conteniendo 2×10^{10} de cada vector en 5 μ l de vehículo) o su vehículo (10 μ 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 ug de PRL con 1×10^6 sinoviocitos sembrados en 600 μ l de medio DMEM por 24 h en ausencia o presencia de TNF- α (25 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IFN- γ (10 ng/ml), solas o en combinación con 10 μ M del inhibidor de MMP, GM6001, y de otros grupos de proteasas ([Macotela et al., 2006](#)). En otros experimentos, lisados (2 μ g/2 μ l) y medios condicionados (5 μ l) de sinoviocitos tratados o no con citocinas serán incubados con 15 μ l de una preparación de PRL (200 ng/ml en 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl₂, 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 SigmaStat11 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](#)

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA NÚMERO TELEFÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**