

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA  
INFLAMACIÓN SINOVIAL EN LA ARTROSIS  
HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> ÁNGELES ÁLVAREZ SORIA**

**Madrid, 2006**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA  
INFLAMACIÓN SINOVIAL EN LA ARTROSIS  
HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> ÁNGELES ÁLVAREZ SORIA  
LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTORES: RAQUEL LARGO CARAZO Y GABRIEL HERRERO-BEAUMONT  
LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR  
FUNDACIÓN JIMENEZ DÍAZ**



Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Doctor en Medicina y Profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña Raquel Largo Carazo, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid,

#### CERTIFICAN

Que Doña M<sup>a</sup> Ángeles Álvarez Soria, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el laboratorio de Patología Osteoarticular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 19 de Septiembre de 2006.

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Dra. Raquel Largo Carazo

Doctoranda: M<sup>a</sup> Ángeles Álvarez Soria

## AGRADECIMIENTOS

Siempre me ha fascinado la perfección y la complejidad de los mecanismos celulares implicados en el funcionamiento del cuerpo humano y esta tesis ha supuesto para mí la posibilidad de explorarlos y comprenderlos un poco mejor. La verdad es que a lo largo de estos años han sido muchos los momentos en los que he pensado que no iba a conseguir llegar al final. Sin embargo ese momento ha llegado y se lo tengo que agradecer a todas esas personas que han confiado en mí y me han animado a continuar. Por todo ello, GRACIAS.

En primer lugar agradezco al Dr. Herrero-Beaumont y al Dr. Egido la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su laboratorio y de introducirme y guiarme en este mundo complejo y a la vez apasionante que es la investigación.

A la fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz y a la Universidad Autónoma de Madrid por las becas que me han permitido desarrollar esta tesis. A la Sociedad Española de Reumatología por el apoyo que presta al desarrollo de nuevos proyectos e ideas.

A Raquel por dirigirme, por enseñarme a trabajar y a pensar en un laboratorio y por contestar tantas y tantas preguntas a lo largo de estos años. A Olga, por todas sus ideas y por animarme a seguir en esos momentos en los que parece que nada va a salir. A Fredy por todas sus aportaciones en este último año. A Emilio por su ayuda al principio en el modelo animal y más tarde con las muestras humanas gracias a las cuales ha sido posible realizar esta tesis. A la Dra. Concha de la Piedra y a Mercedes por todo el apoyo que me han dado durante estos largos meses en los que he estado escribiendo esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Reuma, a Irene, que me ayudó a empezar, a Miriam que siempre está dispuesta a echar una mano, a Juan que aunque no para de “preguntar y no se le entiende nada” ha sido un gran apoyo para mí en el día a día y ha soportado todos mis nervios en los últimos meses. Y a Mónica, que aunque ya no está en el laboratorio espero que sepa que me tiene para lo que necesite.

A los más veteranos del laboratorio, a Carmen, Marta, Jesús G. y Rosario, por haber respondido todas aquellas preguntas que nadie más sabía. Y por supuesto tengo que agradecer esta tesis al resto de mis compañeros del laboratorio, con los que he compartido no sólo el material sino también muchas horas de trabajo, las alegrías y penas y que se han convertido en un apoyo fundamental tanto dentro como fuera del laboratorio. Por ello no me puedo olvidar de Mónica R. por hacerme sentir a gusto en el laboratorio desde el primer momento y de Lupe por estar siempre dispuesta a escuchar mis agobios. ¡Gracias a las dos por brindarme vuestra amistad de forma incondicional y por obligarme a dejar la calceta de vez en cuando!. Por supuesto también tengo que agradecer esta tesis a Almudena por todos los consejos, favores y anticuerpos compartidos, a Oscar por esa ayuda desinteresada que me has dado siempre que te lo he pedido, a Bego por ser capaz de decir siempre lo que piensa, a Roxana por todas esas conversaciones tomando café y pasando frío, a Loli por todas las bromas y comentarios que te alegran el día, a Gisselle por su simpatía y su optimismo en todo momento, a Ana S siempre dispuesta a irse de fiesta, a Pilar por su tranquilidad a la hora de

resolver los problemas, a Puri ¡mi tocaya de cumple!, a Luis y a Jose Luis por los ratitos que han sacado para contestar a mis preguntas a pesar de estar siempre ocupados con el ordenador, a Juan (Cordobés) por su buen humor desde primera hora de la mañana y a Sergio, ¡el murciano más simpático del labo!. Gracias a todos por los buenos momentos vividos, por tener siempre ganas de ir a tomar un café o unas cañas y ¡por aguantarme cuando tenía un mal día!.

También quiero agradecer esta tesis al resto de las personas que trabajan en este laboratorio, a Vanesa, Jon, Elsa, Cecile, Alberto L., Julio, Cristina, Eva, Bea, Alberto B., Alvaro, Albertito, Sebas, Virginia, Beñat, Raquel R., Ana P. y Conchi, porque en mayor o en menor medida también han contribuido al desarrollo de esta tesis y me han ayudado a lo largo de estos años.

Finalmente quiero agradecer esta tesis a mis amigos de siempre, a Monica, Ana, Begoña, Antonio, Fran y Sabi, porque aunque no entienden muy bien de que va esto de la investigación siempre me han animado a seguir y me han apoyado tanto en los días malos como en los buenos.

Y por supuesto, tengo que agradecer esta tesis a mis padres y a mi hermano. Sin vosotros no hubiera llegado hasta el final. Gracias por quererme, por ayudarme a superar todas mis inseguridades y mis miedos, por aceptarme como soy y estar siempre a mi lado.

La artrosis (OA) es la patología articular más frecuente. La característica principal de la OA es la degeneración del cartílago articular, aunque simultáneamente se producen cambios en el metabolismo de la membrana sinovial y del hueso subcondral lo que provoca la aparición de dolor y rigidez y la disminución de la funcionalidad. Aunque tradicionalmente se ha considerado la OA como una enfermedad no inflamatoria, actualmente diferentes trabajos han demostrado que la inflamación sinovial juega un papel importante en la progresión de la OA.

El tratamiento más extendido para controlar los síntomas de la OA son los inhibidores de la COX. Sin embargo, a pesar de la implicación de la PGE<sub>2</sub> en la enfermedad, el uso crónico de inhibidores de la ciclooxigenasa no parece atenuar la progresión de la OA en la práctica clínica. En los últimos años se han empezado a utilizar un grupo de compuestos conocidos como fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la OA (SYSADOA), entre los que se incluyen los compuestos de glucosamina, condroitin sulfato (CS) y diacereina (DC). Estos fármacos controlan los síntomas de la OA y parecen retardar la progresión de la enfermedad, aunque no se conocen los mecanismos moleculares responsables de estos efectos.

En esta tesis hemos demostrado que el tratamiento con fármacos inhibidores de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en pacientes con OA de rodilla induce una disminución en la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis de este prostanoide, como la COX-2 y la mPGES-1. Hemos descrito como dos AINE empleados en la actualidad en el tratamiento de la OA tienen un perfil diferente en cuanto al control de la inflamación sinovial, puesto que su efecto sobre la síntesis de citoquinas y la presencia de células inflamatorias en la membrana sinovial es diferente.

Mediante estudios *in vitro*, hemos demostrado que algunos compuestos derivados de la glucosamina son capaces de inhibir la síntesis de mediadores proinflamatorios así como la presencia de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Otros SYSADOA sólo controlan parcialmente alguno de estos mediadores. Los AINE inhibieron la ruta proinflamatoria más eficazmente que los otros compuestos utilizados en los estudios *in vitro*. Sin embargo, no modificaron o incluso activaron la síntesis de proteasas.

El planteamiento de este trabajo permite abrir nuevas hipótesis en cuanto a la presencia de mecanismos dependientes e independientes de PGE<sub>2</sub> que pueden controlar la inflamación sinovial durante la OA.

## Summary

---

Osteoarthritis (OA) is the most common chronic joint disease. Joint cartilage degeneration is the central feature in OA, but is associated with concomitant changes in synovium and subchondral bone metabolism causing pain and stiffness in the involved joints and an impaired physical function. While OA is traditionally defined as a noninflammatory joint disease, many reports have highlighted the critical role of synovial inflammation in OA progression.

The most widespread agents employed for the control of OA symptoms are COX competitors. In spite of the prominent role of PGE<sub>2</sub> in this disease, the chronic use of agents targeting the COX pathway has for the moment failed to slow OA progression in clinical practice. In the last years a new group of compounds called symptomatic slow acting drugs for OA (SYSADOA) have begun to use. Compounds in this class include glucosamine, chondroitin sulfate (CS) and diacerhein (DC). These drugs are able to palliate the OA symptoms as well as to slow the disease progression, although the molecular mechanism by which SYSADOA modify cell metabolism are still under discussion.

This thesis demonstrates that the long term PGE<sub>2</sub> synthesis inhibitors treatment in patients with knee OA down regulate the expression of the enzymes responsible for the synthesis of the prostanoid, like COX-2 and mPGES-1. However, CBX and ACF, two NSAID currently employed in OA treatment, appear to have different antiinflammatory profiles in controlling OA synovial macrophage infiltration and proinflammatory citoquine expression.

We have demonstrated that some glucosamine compounds are able to control proinflammatory and structural routes. Others SYSADOA only partially control some of the mediators studied. NSAID are able to inhibit proinflammatory mediators more efficiently than the other compounds used in the *in vitro* studies. However they do not modify or even activate MMP synthesis.

This work open new hypothesis for the mechanisms, both PGE<sub>2</sub> dependent and independent, that can control the synovial inflammation in OA.

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LA ARTROSIS.....</b>	<b>1</b>
1.1 Cambios en el cartílago articular.....	2
1.2 Cambios en la membrana sinovial.....	3
1.3 La inflamación en la artrosis.....	3
<b>2. FACTORES IMPLICADOS EN LA ARTROSIS.....</b>	<b>4</b>
2.1 El factor nuclear- $\kappa$ B.....	4
2.2 La familia I $\kappa$ B.....	5
2.3 Activación de NF- $\kappa$ B.....	5
2.4 El factor nuclear AP-1.....	6
<b>3. MOLECULAS IMPLICADOS EN LA ARTROSIS.....</b>	<b>7</b>
3.1 Las citoquinas .....	7
3.2 Los prostanoides.....	8
3.2.1 La ciclooxigenasa.....	9
3.2.2 La prostaglandina E sintasa.....	10
3.2.3 Implicación de la COX-2 y la mPGES-1 en la patogenia de la OA.....	11
3.2.4 La Prostaglandina E <sub>2</sub> ( PGE <sub>2</sub> ).....	12
3.2.5 Los receptores de PGE <sub>2</sub> .....	12
3.3 Las óxido nítrico sintasas (NOS).....	13
3.4 El óxido nítrico (NO).....	14
3.5 Relación entre la PGE <sub>2</sub> y el NO.....	15
3.6 Las Metaloproteasas.....	16
<b>4. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA OA.....</b>	<b>17</b>
4.1 Analgésicos.....	17
4.2 Inhibidores de la COX.....	18
4.3 Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la OA (SYSADOA).....	19
4.4 Glucocorticoides.....	20

<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>1. ESTUDIOS EN PACIENTES.....</b>	<b>22</b>
<b>2. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>23</b>
2.1 Cultivo celular de condrocitos.....	23
2.2 Cultivo celular de sinoviocitos.....	23
2.3 Fármacos empleados en los estudios <i>in vitro</i> .....	24
<b>3. TÉCNICAS EMPLEADAS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	24
3.1.1 Preparación de extractos nucleares y citosólicos.....	24
3.1.2 EMSA.....	24
3.2 Inmunocitoquímica.....	25
3.3 Western Blot.....	25
3.4 Medida de PGE <sub>2</sub> .....	26
3.5 Medida de nitritos.....	26
3.6 Extracción de ARN total.....	27
3.7 Estudios de expresión génica por ensayo de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	27
3.8 Estudios de expresión génica por PCR a tiempo real.....	28
3.9 Estudios histopatológicos del cartílago articular de pacientes.....	29
3.10 Estudios histopatológicos de la membrana sinovial de pacientes.....	30
3.11 Inmunohistoquímica.....	30
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>



<b>1. EFICACIA DE UN INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA COX-2 EN PACIENTES CON ARTROSIS DE RODILLA.....</b>	<b>32</b>
1.1 Información de los pacientes y respuesta clínica.....	32
1.2 Histopatología del cartílago articular.....	33
1.3 Histopatología de la membrana sinovial.....	34
1.4 Inmunohistoquímica de CD68.....	35
1.5 Concentración de la PGE <sub>2</sub> en el líquido sinovial.....	36
1.6 Concentración de NO en el líquido sinovial .....	36
1.7 Expresión y síntesis de la COX-1 y la COX-2.....	37
1.8 Expresión de la mPGES-1.....	38
1.9 Expresión génica de los receptores de la PGE <sub>2</sub> .....	39
1.10 Expresión génica y síntesis de la iNOS .....	39
1.11 Expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$ .....	40
1.12 Síntesis de la MMP-1 y la MMP-3.....	41
<b>2. EFECTO DE LA INTERLEUQUINA (IL)-1<math>\beta</math> Y DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)-<math>\alpha</math> SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PROSTAGLANDINA E2 EN CONDROCITOS SANOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.....	43
2.2 Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la expresión de los receptores EP y la COX-2 en condrocitos de conejo y humanos.....	44
2.3 Efecto del TNF- $\alpha$ sobre la expresión de los receptores EP y la COX-2 en condrocitos de conejo y humanos .....	46
2.4 Efecto de los AINE sobre la expresión génica de los receptores EP1 y EP4 y la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$ .....	48
<b>3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> Y OTROS FÁRMACOS ANTI-OA EN EL METABOLISMO DE CONDROCITOS Y SINOVIOCITOS ARTRÓSICOS EN CULTIVO.....</b>	<b>49</b>
3.1 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.....	49
3.2 Efecto de los fármacos sobre la producción de la PGE <sub>2</sub> .....	49
3.3 Efecto de los fármacos sobre la producción del NO.....	52
3.4 Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la COX-1 y la COX-2.....	53
3.5 Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-1 y la MMP-13.....	55

3.6 Efecto de los fármacos sobre la activación del NFκB.....	58
3.7 Caracterización de las subunidades de la familia NFκB/Rel implicadas en la activación del NFκB inducida por la IL-1 β en condrocitos humanos.....	62
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> EN LA ARTICULACIÓN ARTRÓSICA.....</b>	<b>66</b>
1.1 Efecto sobre la ruta de síntesis de los prostanoides.....	66
1.2 Efecto sobre la expresión de citoquinas.....	68
1.3 Efecto sobre la expresión de las MMP.....	70
<b>2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE EL ESTADO CATABÓLICO DE CONDROCITOS Y SINOVIOCITOS EN CULTIVO.....</b>	<b>71</b>
2.1 Efecto sobre la ruta de síntesis de los prostanoides y la del NO.....	71
2.2 Efecto sobre la síntesis de MMP.....	76
<b>3. IMPLICACIÓN Y MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL NFκB EN LA EXPRESIÓN DE LOS MEDIADORES PROINFLAMATORIOS Y ESTRUCTURALES CARACTERÍSTICOS DE LA OA.....</b>	<b>80</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>

## Abreviaturas

---

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ACF	Aceclofenaco
AcG	N-Acetil Glucosamina
AcM	N-Acetil Manosamina
AH	Ácido Hialurónico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Artritis reumatoide
BSA	Albúmina de suero bovino
CBX	Celecoxib
COX	Ciclooxigenasa
CREB	Elemento de respuesta a AMPc
CS	Condroitín Sulfato
DAB	Diaminobenzidina
DC	Diacereína
DCF	Diclofenaco
DS	Dermatán Sulfato
EEM	Error estándar de la media
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
EP	Receptores de membrana de PGE <sub>2</sub>
ERK	Quinasa regulada extracelularmente
GAG	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Glutation
HG	Hidrocloruro de Glucosamina
HM	Hidrocloruro de Manosamina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
ICE	Enzima convertora de IL-1 $\beta$
I $\kappa$ B	Subunidad inhibidora de NF $\kappa$ B
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IL-1R	Receptor de IL-1
IL-1Ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8

## Abreviaturas

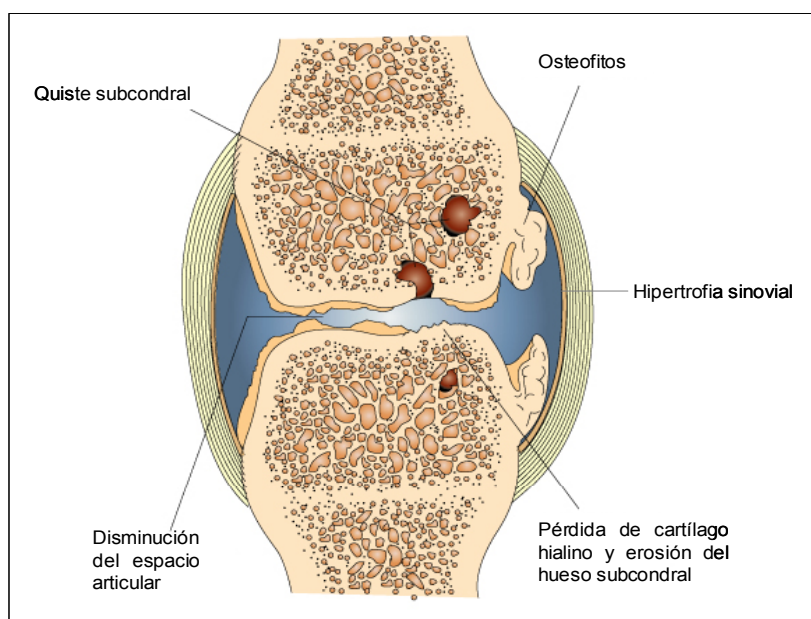
---

IND	Indometacina
LS	Líquido sinovial
MXC	Meloxicam
NOS	Oxido nítrico sintasa
KS	Keratán Sulfato
LIF	Factor inhibidor de leucocitos
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MMP	Metaloproteasas
MP	6 $\alpha$ -Metilprednisona
NAC	N-Acetil Cisteína
NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
NF $\kappa$ B	Factor nuclear- $\kappa$ B
NO	Oxido nítrico
NO <sup>-2</sup>	Nitritos
NO <sup>-3</sup>	Nitratos
O <sup>2-</sup>	Anión superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OA	Artrosis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES	Prostaglandina E sintasa
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
RT-PCR	Ensayo de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SG	Sulfato de Glucosamina
STAT	Transductores de la señal y activadores de la transcripción
STF	Suero de ternera fetal
SYSADOA	Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis
TACE	Enzima conversora de TNF- $\alpha$
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
TNFR	Receptor de TNF
UAD	Unidades arbitrarias de densitometrado
WOMAC	Índice de OA de las universidades de Western Ontario y McMaster

# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. LA ARTROSIS.

La artrosis (OA) es la patología degenerativa de la articulación más frecuente. La característica principal de la OA es la degeneración del cartílago articular, aunque simultáneamente se producen cambios en la cápsula articular, los tejidos blandos periarticulares, la membrana sinovial y en el hueso subcondral lo que provoca la aparición de dolor y rigidez en las articulaciones afectadas y la disminución de la funcionalidad (Pelletier JP, 2001a) (Figura 1). No se conoce con exactitud la etiología exacta de la OA, aunque se sabe que los cambios estructurales son debidos a la combinación de diversos factores sistémicos (densidad mineral ósea, factores genéticos, edad) y locales (obesidad, ejercicio físico) (Nuki G, 1999).



**Figura 1: cambios que se producen en la articulación artroscópica.**

El cartílago articular está sujeto a un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación de la matriz). Normalmente estos dos procesos están en equilibrio y las moléculas destruidas son reemplazadas por moléculas nuevas. En los estadios iniciales de la OA en un primer intento de reparación se produce por parte de los condrocitos una reacción hipertrófica con aumento de la síntesis de la matriz cartilaginosa. A esta fase inicial hipertrófica le sigue un recambio acelerado en los componentes de la matriz y una depleción clara de proteoglicanos, para acabar finalmente, en una pérdida de la estructura de la red de colágeno. En esta etapa se produce la activación de la membrana sinovial. Los fibroblastos y macrófagos de este tejido sintetizan elevadas cantidades de IL-1 $\beta$  y, en menor medida, de TNF- $\alpha$ . En los estadios finales de la OA, la inflamación sinovial se mantiene, al menos en parte, por fragmentos de cartílago articular y cristales de pirofosfato cálcico, de hidroxapatita y de urato monosódico liberados del cartílago dañado. Estos factores son capaces de estimular las células de la membrana sinovial para sintetizar y liberar un elevado número de mediadores inflamatorios, que se asemejan a aquellos que se encuentran en enfermedades articulares inflamatorias, como la artritis reumatoide (Schumacher HR, 1995). Las citoquinas proinflamatorias se difunden a través del líquido sinovial llegando a la superficie articular donde se une a los receptores de

superficie existentes en el condrocito, liberándose finalmente más citoquinas inflamatorias y proteasas que perpetúan el proceso de degradación del cartílago articular (Benito-Ruiz P, 2000).

De esta forma, el concepto clásico de OA, en el cual se otorgaba mayor importancia a la activación directa del cartílago y del hueso subcondral, ha cambiado, dándose también una gran importancia a la activación de la membrana sinovial que se produce en los estadios finales de la enfermedad, hasta el punto de que los cambios patológicos que se producen en la membrana sinovial de un paciente con OA pueden ser incluso tan severos como los que se producen en un paciente con artritis reumatoide (Farahat MN, 1993).

### 1.1 Cambios en el cartílago articular.

Independientemente de cuál sea el factor desencadenante, en el cartílago se producen una serie de eventos bioquímicos y moleculares que originan la aparición de cambios macroscópicos y microscópicos en todos los niveles del cartílago articular:

- **Estructura del cartílago articular:** se produce una fibrilación superficial progresiva, que se extiende hasta el hueso subcondral, produciendo una disminución progresiva del grosor del cartílago articular con pérdida completa en algunas zonas (Figura 2).
- **Condrocitos:** En la OA se produce un aumento inicial en la densidad celular y capacidad sintetizadora en un intento de compensar la pérdida de matriz extracelular, pero finalmente el número de células existentes en el tejido disminuye (figura 2). El número de células va a depender del equilibrio entre división y muerte celular. En los últimos años ha cobrado especial relevancia el papel de la muerte celular del condrocito por apoptosis que conduce a un cartílago hipocelular (Pelletier JP, 2001a).

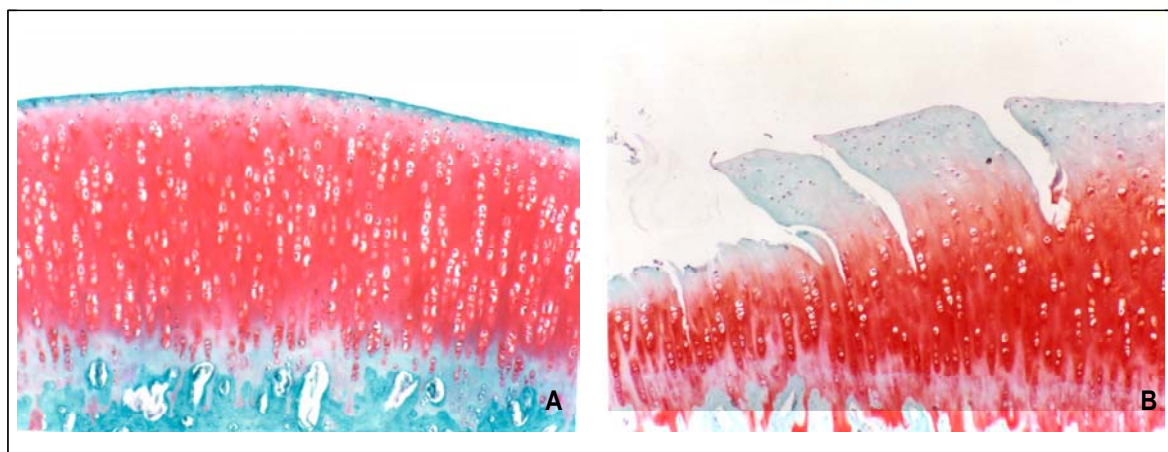


Figura 2: Imagen microscópica del cartílago articular normal (A) y artrósico (B), en la que se puede observar los cambios que acontecen en el tejido dañado.

- **Matriz:** inicialmente se produce un aumento del contenido de agua, proteoglicanos y concentración de fibronectina existente en el cartílago. Pero en estadios mas avanzados de la

enfermedad se produce una disrupción de la organización del colágeno y una pérdida progresiva de proteoglicanos, AH y colágeno.

## 1.2 Cambios en la membrana sinovial.

Los cambios que acontecen en la membrana sinovial artrósica afectan a varios niveles: se produce una hiperplasia moderada de la capa íntima, edema intersticial, incremento de la vascularización, activación de las células residentes del estroma e infiltrado moderado de la membrana sinovial por células inflamatorias, incluyendo células B y T activadas (Saito I, 2002).

Estudios histopatológicos de la membrana sinovial de pacientes con OA demostraron la presencia de sinovitis en dichas membranas, localizada junto a las zonas en las que se produce la degeneración del cartílago articular (Saito I, 2002). Además Shibakawa *et al.* demostraron la presencia de un pannus en la articulación artrósica, que mediante la liberación de colagenasas contribuye a la destrucción del cartílago articular (Shibakawa A, 2003).

## 1.3 La inflamación en la artrosis.

Algunos estudios clínicos han demostrado que la sinovitis en la OA se correlaciona con un peor pronóstico y con una progresión acelerada de la enfermedad (Pelletier JP, 2001b; Sharif M, 2000). Un estudio ecográfico ha demostrado que el 70% de los pacientes con artrosis de rodilla sintomática presenta sinovitis (Wakefield RJ, 1998). Además, la sinovitis es una de las causas principales de dolor en la enfermedad. De hecho, la intensidad de la sinovitis (medida por artroscopía) se correlaciona con la gravedad del dolor en enfermos con OA de rodilla, y ambos procesos mejoran con el tratamiento con corticoides intraarticulares (Jones A, 1996). A pesar de estos hallazgos, se desconoce el mecanismo celular por el que la inflamación sinovial influye en el deterioro de la articulación artrósica de forma que se ha considerado tradicionalmente como un proceso secundario relacionado con la destrucción del cartílago y con la consiguiente liberación de fragmentos en el líquido sinovial. En la superficie del cartílago artrósico se han encontrado inmunocomplejos que contenían anticuerpos para el colágeno tipo II (Cooke TD, 1980). Sin embargo la inflamación sinovial no solo influye en la fase final de la enfermedad sino que se ha demostrado la existencia de diversos grados de sinovitis tanto en estadios tempranos (Smith MD, 1997) como en las fases finales de la OA (Farahat MN, 1993).

Existen otras evidencias que demuestran que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la OA. La membrana sinovial y el cartílago sintetizan una serie de citoquinas y factores de crecimiento que juegan un importante papel en el desarrollo de la OA (Pelletier JP, 2001a; Martel-Pelletier J, 1999). Estos mediadores están muy relacionados con las alteraciones funcionales que se producen no solo en la membrana sinovial sino también en el cartílago y el hueso subcondral. En este sentido, existen dos citoquinas proinflamatorias que juegan un papel fundamental en la destrucción del cartílago articular: la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (Caron JP, 1996; Van de Loo FAJ, 1995). Estas dos citoquinas son capaces de estimular su propia producción a la vez que inducen, tanto en condrocitos como en sinoviocitos, la síntesis de otras citoquinas como la IL-8, la IL-6, el factor inhibidor de leucocitos (LIF),



así como de proteasas (colagenasas, estromelisin, agreganasas), mediadores lipídicos (PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>) y radicales libres (NO) (López-Armada MJ, 2004; Mor A, 2005). Además la expresión de las enzimas responsables de la activación de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , y de los receptores a los cuales se unen, se encuentra incrementada en el cartílago y la membrana sinovial artrósica (Saha N, 1999; Amin AR, 1999; Sadouk M, 1995; Westacott CI, 1994).

Otras moléculas muy implicadas en la inflamación en la OA son el óxido nítrico (NO) y la prostaglandina E<sub>2</sub>. El cartílago artrósico produce elevadas cantidades de NO (Pelletier JP, 1996) y en el líquido sinovial y suero de pacientes con enfermedades reumatoideas se han encontrado cantidades elevadas de nitritos/nitratos (Farrell AJ, 1992) sintetizados por la forma inducible de la enzima NO sintasa (iNOS) que también se encuentra elevada en la OA (McInnes IB, 1996). Los tejidos articulares artrósicos liberan gran cantidad de prostaglandinas, especialmente PGE<sub>2</sub> (Amin AR, 1997) siendo esta la principal prostaglandina sintetizada tanto por condrocitos como por sinoviocitos (Knott I, 1994). En cultivos *ex vivo* se observó que el cartílago artrósico libera de forma espontánea PGE<sub>2</sub> a una concentración mucho mayor que el cartílago articular normal estimulado con IL-1 $\beta$  (Amin AR, 1997). Así mismo, la COX-2 y la mPGES-1, las enzimas responsables de la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, se encuentran incrementadas en la membrana sinovial y el cartílago de pacientes con OA (Amin AR, 1997; Koki A, 2002; Park JY, 2006).

## **2. FACTORES IMPLICADOS EN LA ARTROSIS.**

Las células implicadas en el desarrollo de la OA deben responder a los cambios ambientales que se presenten y para ello disponen de diferentes mecanismos intracelulares que transmiten la señal desde la superficie hasta el núcleo celular, induciendo la activación de diferentes factores de transcripción. Los factores nucleares son pequeñas proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN, en las regiones promotoras de genes dianas, para controlar su transcripción. Existen diferentes familias de factores de transcripción implicados en el control de la expresión génica en situaciones inflamatorias, como son la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear de células T activadas (NF-AT), el factor nuclear-kappaB (NF- $\kappa$ B), el factor de transducción y activación de la transcripción (STAT), p53 y los receptores nucleares de hormonas.

### **2.1 El factor nuclear- $\kappa$ B.**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que se expresa prácticamente en todos los tipos celulares y que participa en la transcripción génica de numerosos genes, y en concreto, de muchos genes que juegan un papel fundamental en la evolución de las enfermedades reumáticas (Manning AM, 1994). Este factor nuclear se localiza en la membrana sinovial de tejidos tanto artríticos como artrósicos, siendo esencial en la iniciación y perpetuación de la sinovitis crónica y en la hiperplasia de la membrana sinovial (Firestein GS, 1999). En cuanto al cartílago, el NF- $\kappa$ B está implicado en la respuesta del cartílago articular a la sobrecarga y en condrocitos se produce la activación de este factor tras la estimulación con la IL-1 $\beta$ . Además el NF- $\kappa$ B regula la expresión de muchos genes

implicados en la fisiopatología de la destrucción articular como MMP-1, MMP-3, MMP-13, COX-2, iNOS, etc. (Berenbaum F, 2004).

El NF- $\kappa$ B es un homodímero o heterodímero formado por los miembros de la familia de proteínas Rel, de la cual se han identificado hasta el momento cinco integrantes: c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), Rel A (p65) y Rel B. Todas estas proteínas presentan una región muy conservada de aproximadamente 300 aminoácidos en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal, denominada dominio de homología Rel (DHR) (Lee JI, 1998). Dicha región es la responsable de la unión al ADN, la dimerización y la fusión con los miembros de la familia de proteínas inhibitorias I $\kappa$ B. El DHR contiene además una señal de localización nuclear (SLN) que facilita la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. El dímero clásico del NF- $\kappa$ B (p50/p65) está formado por las subunidades Rel A y NF- $\kappa$ B1, sin embargo, aunque menos frecuentes, se conocen otros dímeros formados por diferentes subunidades que tienen una función biológica diferente.

## 2.2 La familia de I $\kappa$ B.

Está integrada por las proteínas I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , Bcl-3, los precursores de NF- $\kappa$ B1 (p105) y de NF- $\kappa$ B2 (p100) y la proteína Cactus Drosophila (Whiteside ST, 1997). Contienen entre cinco y siete repeticiones conservadas de tipo ankirina, fundamentales para su unión al NF- $\kappa$ B a través de los dominios DHR del dímero. De este modo, la subunidad inhibitoria enmascara la SLN e impide la translocación al núcleo (Whiteside ST, 1997). Las proteínas I $\kappa$ B, poseen además una secuencia de desestabilización en la región COOH-terminal, que favorece su degradación proteolítica (Lee JI, 1998; Rothwarf DM, 1999). La interacción entre las subunidades inhibitorias y los miembros de la familia Rel es específica, de manera que, mientras que I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$  inhiben los dímeros que contengan p65 y/o c-Rel, I $\kappa$ B- $\gamma$  y Bcl-3 se unen preferentemente a los complejos que contengan p50 y/o p52 (Beg AA, 1993).

## 2.3 Activación de NF- $\kappa$ B.

Los complejos NF- $\kappa$ B se encuentran localizados en el citoplasma celular en su estado inactivo, asociados a la proteína inhibitoria I $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B puede activarse por diferentes estímulos tales como: citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), células mitógenas T y B, proteínas virales, liposacárido bacteriano (LPS), RNA de doble banda, factores de crecimiento, LDLox, estímulos inmunológicos y el estrés físico o químico.

En primer lugar se produce la fosforilación de dos serinas (la Ser<sup>32</sup> y la Ser<sup>36</sup>) de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B (principalmente de I $\kappa$ B- $\alpha$ ). La fosforilación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B- $\alpha$  se ha descrito que podría realizarse por las subunidades catalíticas del complejo IKK, IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  (Regnier C, 1997). Esta fosforilación permite el reconocimiento de la región NH<sub>2</sub>-terminal de I $\kappa$ B- $\alpha$  por la proteína 1 que conducirá a la poliubiquitinación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y finalmente a la degradación por el proteosoma 26S, exponiéndose la región SLN del NF- $\kappa$ B. El dímero libre se transloca al núcleo, donde se une a los sitios- $\kappa$ B de los genes para activar su transcripción (Figura 3).

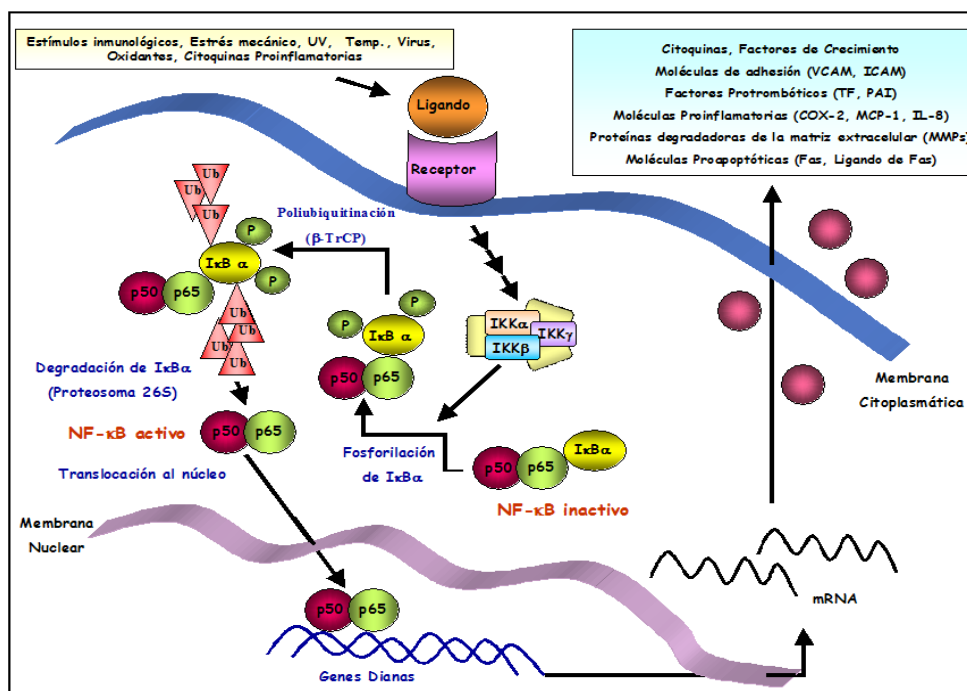


Figura 3: Mecanismos de activación de NF-κB.

## 2.4 El factor nuclear AP-1.

El factor nuclear AP-1 es un factor de transcripción muy implicado en la activación de las células T, la síntesis de citoquinas y la producción de metaloproteasas (Angel P, 1991). Diferentes estímulos son capaces de inducir la activación de este factor nuclear, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento y la oncoproteína Ras. AP-1 es un homodímero o heterodímero formado por los miembros de las familias de proteínas Jun (c-jun, jun B, jun D), Fos (c-fos, fos B, Fra-1 y Fra-2) y ATF (ATF-2 y ATF-3), caracterizadas todas ellas por tener un dominio de unión a DNA leucine zipper. Se conocen diferentes variantes de este factor nuclear, de forma que se une al DNA y activa la transcripción en forma de homodímeros Jun o heterodímeros Jun-Jun o Jun-Fos.

AP-1 tiene un papel fundamental en la expresión de muchos genes implicados en patologías articulares como el TNF-α, colagenasas y estromelinas. En la membrana sinovial normal no se localiza este factor nuclear, sin embargo tanto en la membrana sinovial artrítica como en la artrósica se han detectado las proteínas que forman parte del factor nuclear AP-1, aunque los niveles de AP-1 activado son mucho más altos en el tejido sinovial artrítico (Firestein GS, 1999). AP-1 es esencial en la regulación del desarrollo del cartílago y de la diferenciación de los condrocitos estando implicado en la condrogénesis (Tufan AC, 2002) y en la regulación de la maduración hipertrófica de los condrocitos (Moritani NH, 2003). Además AP-1 participa en la destrucción del cartílago articular en enfermedades reumatoides, de forma que se ha demostrado que un aumento en la expresión de c-fos inhibe la síntesis de proteoglicanos en condrocitos articulares (Tsuji M, 1996).

### 3. MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ARTROSIS.

El proceso inflamatorio y la degradación del cartílago en la artrosis está regulado por una serie de moléculas de distinta naturaleza y función. Entre estos mediadores, cabe destacar las citoquinas, las quimioquinas, los prostanoïdes, las metaloproteasas y las especies reactivas de oxígeno.

#### 3.1 Las Citoquinas.

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. Tienen funciones a nivel fisiológico en la homeostasis de los órganos y participan también en la reparación del tejido dañado. Sin embargo, su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas (Arend WP, 1990).

Hay dos tipos de citoquinas dependiendo de la función que ejercen: las citoquinas proinflamatorias y las inmunoregulatoras. Dentro del primer grupo, se encuentran el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6. Son sintetizadas por macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, y son responsables de la activación de un gran número de células (Duff GW, 1994). En concreto, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , son dos de los principales mediadores que participan en la destrucción del cartílago en la OA. Estas citoquinas son capaces de inducir su propia producción al tiempo que inducen en sinoviocitos y condrocitos la síntesis de otros mediadores como la IL-8, la IL-6 y el factor inhibidor de leucocitos (LIF) (López-Armada MJ, 2004; Mor A, 2005). Ambas citoquinas, son capaces de incrementar en los dos tipos celulares la expresión de la COX-2 y la iNOS, y por tanto de los mediadores proinflamatorios que sintetizan estas dos enzimas, la PGE<sub>2</sub> y el NO (López-Armada MJ, 2004; Mor A, 2005). Estas citoquinas también son capaces de aumentar la producción de otras moléculas implicadas en el desarrollo de la enfermedad como son proteasas, quimioquinas y moléculas de adhesión. Finalmente, tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  disminuyen la síntesis de proteoglicanos y de colágeno tipo II en los condrocitos, aumentando en cambio la expresión de los colágenos tipo I y III (López-Armada MJ, 2004; Mor A, 2005). La suma de todos estos efectos tiene como resultado final la puesta en marcha del programa catabólico que se produce en la OA.

La IL-1 es una citoquina de 17 kDa producida por una gran variedad de células. Su gen codifica 2 isoformas con un 25% de homología, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ésta última representa el 90% de la IL-1 liberada al medio extracelular, mientras que la IL-1 $\alpha$  es una molécula inicialmente unida a membrana. Ambas proteínas surgen de precursores de aproximadamente 30 kDa. Su activación depende de una proteasa denominada enzima convertora de IL-1 $\beta$  (ICE), o caspasa-1, que está incrementada tanto en el cartílago como en la membrana sinovial artrósica (Saha N, 1999). La IL-1 produce diferentes efectos biológicos a través de su unión a receptores específicos, conocidos como IL-1R. Se han identificado dos variantes, el IL-1R tipo I y tipo II (Slack J, 1993). El receptor tipo I se encuentra incrementado tanto en condrocitos como en sinoviocitos artrósicos, lo cual hace a estas células más sensibles a la IL-1 $\beta$  (Sadouk M, 1995).

La familia del TNF consta por lo menos de 18 miembros distintos que exhiben un 15-25% de homología en su secuencia de aminoácidos. El TNF- $\alpha$  se sintetiza en forma de precursor inactivo unido a la membrana. Es necesario la actuación de la enzima convertora de TNF- $\alpha$  (TACE) para su activación (Black RA, 1997). Recientemente, se ha demostrado que esta enzima se encuentra elevada en el cartilago de pacientes con OA (Amin AR, 1999). La forma nativa del TNF- $\alpha$  es un polipéptido de 45 KDa, constituido por monómeros de 17 KDa que se unen por interacciones no covalentes formando trímeros. Se han descubierto dos receptores distintos para esta citoquina, de 55 y 75 KDa (TNFR55 y TNFR75). El TNFR55, que parece ser el más implicado en la actividad del TNF- $\alpha$  en la OA y está incrementado tanto en condrocitos como en sinoviocitos artrósios (Alaaeddine N, 1997).

### 3.2 Los Prostanoides.

Los prostanoides son productos de la ciclooxigenasa (COX) derivados de ácidos grasos insaturados (C-20). Se clasifican en Prostaglandinas (PG) y Tromboxanos. Ejercen una gran variedad de acciones en diferentes tejidos y células. Las acciones más típicas son la vasorelajación y vasoconstricción de varios tipos de músculo liso. Además, modulan la actividad neuronal y participan en la regulación de la secreción y movilidad del tracto gastrointestinal, así como en el transporte de iones y agua en el riñón. Están implicados en apoptosis, diferenciación celular y oncogénesis. Asimismo, participan en la regulación de la actividad plaquetaria y en la homeostasis (Narumiya S, 1999).

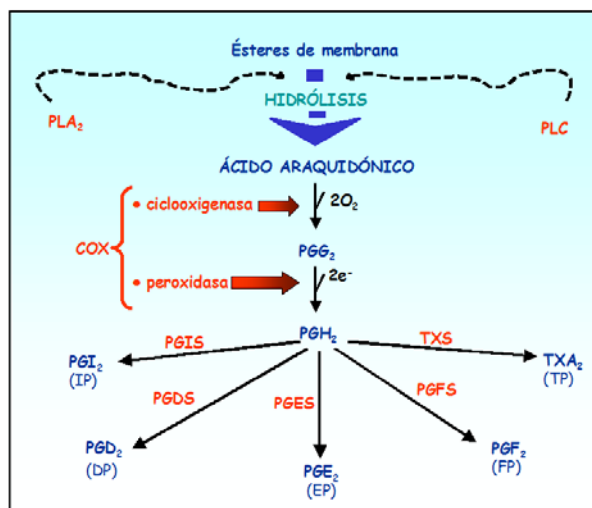


Figura 4. Ruta de síntesis de los Prostanoides.

Los precursores de estos compuestos son los ácidos grasos poliinsaturados, que se transforman por esterificación en glicerol, colesterol y fosfolípidos que quedan almacenados en la membrana plasmática. El mecanismo biosintético de los prostanoides engloba tres pasos: (1) la liberación de ácidos grasos de la membrana, siendo el ácido araquidónico (AA) el más abundante de todos ellos, (2) su conversión en un endoperóxido inestable (PGH<sub>2</sub>), y (3) la isomerización o reducción de este producto intermedio hasta formar las PG (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), las prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y los tromboxanos (TxA<sub>2</sub>) (Smith WL, 1991).

En la primera fase participan dos sistemas de lipasas activadas por la interacción de un estímulo con su receptor en la célula diana, son la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que hidrolizan los fosfolípidos de membrana liberando el AA que es el sustrato de la PGH sintasa o COX, enzima que cataliza la oxidación del ácido graso para formar la PGG<sub>2</sub> y su posterior reducción a la PGH<sub>2</sub> (esta reacción se explicará más detalladamente en el apartado siguiente).

A partir de este metabolito intermedio (PGH<sub>2</sub>) debido a la acción de las correspondientes enzimas sintasas (TXS, PGIS, PGDS, PGES y PGFS), se obtienen los diferentes prostanoídes (TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>) respectivamente. Los diferentes prostanoídes ejercen su acción a través de sus correspondientes receptores de membrana (TP, IP, DP, EP y FP) (Figura 4).

### 3.2.1 La ciclooxigenasa.

La Ciclooxigenasa (COX) es una hemoproteína de membrana que cataliza la conversión del AA a la PGH<sub>2</sub>. Es una proteína bifuncional con dos actividades independientes: ciclooxigenasa y peroxidasa. La COX cataliza dos reacciones secuenciales en distinto espacio pero mecánicamente acopladas. La primera reacción ciclooxigenasa convierte el AA en la PGG<sub>2</sub>, seguido de la segunda reacción peroxidasa que reduce la PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>.

- La reacción catalizada por la actividad ciclooxigenasa de la COX, comienza con la eliminación de un átomo de H del AA y la formación de dos radicales consecutivos, ambos susceptibles a los ataques por moléculas de O<sub>2</sub>. La reducción final del radical peroxilo resultante, da lugar al endoperóxido cíclico PGG<sub>2</sub> (Black RA, 1997).
- La segunda reacción es catalizada por su actividad peroxidasa que reduce el PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> por la aportación simultánea de dos electrones por un agente reductor. En esta reacción es necesario la acción del grupo hemo de la enzima, que se oxida para formar un radical intermedio en el que el átomo de Fe pasa de un estado de oxidación +3 a +4.

El modelo del centro activo de la COX que describieron Smith y colaboradores en el año 90 consideraba que las dos actividades enzimáticas de la COX tenían lugar en sitios separados (Smith WL, 1990). Así, en el centro activo existe un sitio de unión al sustrato (AA) y otro sitio de unión a hidroperóxidos cerca del grupo hemo de la proteína. Próximo a este grupo prostético se dispone un residuo de Tyr que actúa como conductor de electrones entre ambas zonas, permitiendo que las reacciones de las dos actividades enzimáticas de la COX sean secuenciales y estén acopladas.

Aunque la COX se purificó a partir de vesículas seminales en la década de los 70 y en 1976 se determinó la secuencia genómica de la COX ovina (Hemler M, 1976), la existencia de las dos isoformas no se describió hasta los años 90 (Fu JY, 1990).

- **La COX-1:** es la isoforma constitutiva, está localizada en casi todos los tejidos del organismo, y su expresión parece estar regulada en situaciones muy concretas como la diferenciación celular. Las PG derivadas de esta enzima participan en las respuestas fisiológicas, como la homeostasis vascular, la reabsorción renal de Na<sup>+</sup> y la citoprotección del estómago (DeWitt D, 1995).
- **La COX-2:** no se expresa en la mayoría de las células en condiciones normales, y su expresión es inducible como respuesta a citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento o

endotoxinas. La elevada producción de la COX-2 se considera el mecanismo por el que aumentan los niveles de las PG durante la inflamación (DeWitt D, 1995).

En humanos, los genes de las dos isoformas se localizan en distintos cromosomas, aunque presentan un número similar de exones e intrones. El tamaño de los intrones de la COX-2 es menor, por este motivo el gen de COX-2 (8 Kb) se transcribe y se procesa más rápidamente que el de la COX-1 (22 Kb) (Crofford LJ, 1997). La regulación transcripcional resulta muy diferente en las dos isoformas. El promotor de la COX-1 es un gen constitutivo apenas inducible. Sin embargo, el promotor del gen de la COX-2 contiene secuencias consenso para muchos factores de transcripción implicados en procesos inflamatorios, tales como el factor nuclear de IL-6 (NF-IL6), el elemento de respuesta a AMPc (CREB) o el NF- $\kappa$ B (Appleby SB, 1994). El transcrito de la COX-2 presenta una región no transduccional en el extremo 3', rica en secuencias "AUUUA", que le da una gran inestabilidad, lo que explicaría la inestabilidad del ARNm de la COX-2 y su rápida degradación. La estimulación con citoquinas proinflamatorias estabiliza el ARNm de la COX-2 y el tratamiento con glucocorticoides lo desestabiliza (Crofford LJ, 1997).

La estructura proteica y su mecanismo catalítico en ambas isoformas es muy similar. Presentan una homología de secuencias de un 65%, conservando los aminoácidos esenciales del centro activo. La estructura terciaria es muy semejante. Son proteínas diméricas de aproximadamente 70 kDa, que forman una asociación monotópica. Cada monómero contiene tres dominios independientes: (1) de unión a la membrana, (2) dominio tipo factor de crecimiento epidérmico relacionado con su localización (EGF-like) y (3) un dominio catalítico situado en el centro de un canal hidrofóbico de hélices  $\alpha$ .

La distribución de las isoformas difiere entre las especies y en los distintos tejidos. En la articulación, la COX-1 se expresa tanto en condrocitos como en sinoviocitos sanos. En cambio la COX-2 es detectable en situaciones patológicas en el cartílago y la membrana sinovial tanto de pacientes con artritis como con OA (Pelletier JM, 2003). En cuanto a la localización celular se ha visto que ambas enzimas se localizan tanto en el retículo endoplásmico como en la membrana nuclear encontrándose ambas isoformas en concentraciones similares en los dos compartimentos celulares (Spencer AG, 1998).

### 3.2.2 La Prostaglandina E Sintasa.

La Prostaglandina E sintasa (PGES) es la enzima que cataliza la isomerización de la PGH<sub>2</sub> a la PGE<sub>2</sub>. La PGES presenta tres isoformas:

- La PGES microsomal 1 (mPGES-1), es la isoforma inducible y está acoplada funcionalmente a COX-2 (Murakami M, 2000). Es una proteína de 16 kDa, localizada en la membrana nuclear y que requiere glutation (GSH) como cofactor esencial para su actividad enzimática (Jakobsson PJ, 1999). La expresión de la mPGES-1 es inducida por estímulos proinflamatorios, como la IL-1, el TNF o el LPS *in vitro* (Jakobsson PJ, 1999) e *in vivo* (Ek M, 2001), contribuyendo a la producción de la PGE<sub>2</sub> durante la respuesta inflamatoria. Se ha descrito la implicación de esta enzima en las enfermedades reumatoides ya que, su expresión está aumentada tanto en artritis como en OA. Además recientemente estudios inmunohistoquímicos han demostrado que las proteínas mPGES-1 y COX-2

colocalizan en la región perinuclear tanto de condrocitos (Kojima F, 2004) como de sinoviocitos (Kojima F, 2002) estimulados con la IL-1 $\beta$ .

- La PGES microsomal 2 (mPGES-2), es una proteína de 33 kDa que se expresa constitutivamente en diferentes tipos celulares y cuyos niveles no aumentan en situaciones inflamatorias (Murakami M, 2003). Esta enzima no necesita glutatión (GSH) como cofactor esencial y parece estar acoplada tanto a la COX-1 como a la COX-2 en la producción de la PGE<sub>2</sub> en procesos de inflamación crónica y aguda respectivamente (Murakami M, 2003).
- La PGES citosólica (cPGES), es una proteína citosólica de 26 kDa que se expresa constitutivamente en una gran variedad de tejidos y células y cuya expresión no está inducida por estímulos proinflamatorios, a excepción del cerebro de rata donde el tratamiento con el LPS incrementa los niveles de la cPGES (Tanioka T, 2000). Esta isoforma aparece localizada en el citosol y está acoplada principalmente a la COX-1. Se ha observado que la cPGES está implicada en la protección gastrointestinal y algunas funciones neuronales (Tanioka T, 2000).

La múltiple identificación de enzimas de la PGES revela la existencia de al menos dos rutas biosintéticas segregadas, la vía constitutiva COX-1-cPGES y la vía inducible COX-2-mPGES.

### 3.2.3 Implicación de la COX-2 y la mPGES-1 en la patogenia de la OA.

Existen numerosos trabajos que demuestran la implicación de la mPGES-1 y la COX-2 en la patogenia de la OA. La mPGES-1 se localiza en la capa superficial del cartílago humano artrósico, al igual que IL-1 $\beta$  lo cual es consistente con el hecho de que la citoquina incrementa la producción de la mPGES-1, y por tanto de la PGE<sub>2</sub>, en la OA (Li X, 2005). La otra enzima implicada en la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, en situaciones inflamatorias, la COX-2, también se encuentra incrementado en la membrana sinovial y el cartílago procedente de pacientes artrósicos (Amin AR, 1997; Koki A, 2002). Estudios realizados *ex vivo* ponen de manifiesto que los condrocitos artrósicos responden a la estimulación con la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  incrementando la expresión y síntesis de la mPGES-1 y la COX-2 de forma tiempo y dosis dependiente (Masuko-Hongo K, 2004; Kojima F, 2004). Además la concentración de la PGE<sub>2</sub> se correlaciona con los niveles de la mPGES-1 que se observan en condrocitos artrósicos tras la estimulación con la IL-1 $\beta$  (Masuko-Hongo K, 2004). Por otro lado, en muestras de tejido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas existe una tinción positiva para la mPGES-1 localizada en la capa íntima de la membrana sinovial (Westman M, 2004). Además, mediante estudios inmunohistológicos se observó que las células que sintetizaban la mPGES-1 en la membrana sinovial de los pacientes eran fundamentalmente macrófagos y fibroblastos sinoviales (Westman M, 2004). Varios trabajos han estudiado el papel de la mPGES-1 *ex vivo* en células o tejidos procedentes de articulaciones artríticas de forma que han demostrado que la estimulación con la IL-1 $\beta$  incrementa significativamente la expresión y síntesis de la mPGES-1 y de la COX-2, así como la producción de la PGE<sub>2</sub> en sinoviocitos (Stichtenoth DO, 2001; Kojima F, 2002). Así mismo se ha visto incrementada la expresión de la COX-2 en los fibroblastos sinoviales y en los vasos sanguíneos de la membrana sinovial de pacientes artrósicos (Siegle I, 1998; Koki A, 2002).



### 3.2.4 La Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).

La PGE<sub>2</sub> es el principal prostanoide producido por muchos tejidos y tipos celulares. Trabajos recientes usando genes dianas o inhibidores específicos han confirmado la relevancia de la PGE<sub>2</sub> como mediador de la respuesta inflamatoria (Morham SG, 1995; Ballou LR, 2000; Portanova JP, 1996). La PGE<sub>2</sub> regula la respuesta inmune (Narumiya S, 1999; Zhang Y, 2000) y afecta a la remodelación, formación y resorción ósea (Jee WS, 1987; Miyaura C, 2000).

En cuanto a enfermedades reumáticas, se ha demostrado que los tejidos articulares artrósicos liberan gran cantidad de prostaglandinas, especialmente de PGE<sub>2</sub> (Amin AR, 1997) siendo esta la principal prostaglandina sintetizada tanto por condrocitos como por sinoviocitos (Knott I, 1994). En el tejido y el líquido sinovial artrósico existe un incremento en la concentración de PGE<sub>2</sub> (Crofford LJ, 1999; Sahap Atik O, 1990) y aunque la membrana sinovial parece ser la principal fuente de la producción de la PGE<sub>2</sub> durante la OA (Wittenberg RH, 1993) en cultivos *ex vivo* se observó que el cartílago artrósico libera de forma espontánea PGE<sub>2</sub> a una concentración mucho mayor que el cartílago articular normal estimulado con la IL-1 $\beta$  (Amin AR, 1997). Los signos clásicos de la inflamación aguda (dolor, eritema, edema y calor) pueden ser reproducidos por las acciones de las prostaglandinas al estimular la vasodilatación, incrementar la permeabilidad vascular y contribuir a la sensibilización al dolor. La PGE<sub>2</sub> estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular contribuyendo a los fenómenos de angiogénesis (Ben-Av P, 1995). Así mismo, la PGE<sub>2</sub> puede desempeñar un papel clave como mediador de la erosión del cartílago y del hueso yuxtaarticular al incrementar la síntesis de las MMP, importantes mediadores de la degradación tisular, en condrocitos articulares humanos (Bunning RA, 1989), sinoviocitos (Mehindate K, 1995) y explantes de cartílago artrósico (Amin AR, 1997) y disminuir la síntesis de proteínas de matriz como el colágeno. Otros estudios han demostrado que la PGE<sub>2</sub> presenta también efectos antiproliferativos y proapoptóticos (revisado en Martel-Pelletier J, 2003; Goetzl EJ, 1995).

Sin embargo, la PGE<sub>2</sub> también presenta efectos antiinflamatorios. Diferentes autores han observado que la PG es capaz de disminuir la expresión y síntesis de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , de la iNOS y de la MMP-1 y la MMP-3 (Blanco FJ, 1995b; Di Battista JA, 1994; Knudsen PJ, 1986; Milano S, 1995). Finalmente, varios trabajos han descrito que la PGE<sub>2</sub> puede actuar de forma anabólica incrementando la producción de colágeno y proteoglicanos en el cartílago mediante la activación del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) (Di Battista JA, 1997; Goldring MB, 1999).

### 3.2.5 Los receptores de PGE<sub>2</sub>.

La PGE<sub>2</sub> ejerce su acción a través de cuatro receptores de membrana que se denominan EP (1-4). La estructura de estos receptores presenta muchas semejanzas estando formados por siete dominios transmembrana, conservando 28 aminoácidos en esta región. También conservan con respecto a otros receptores tipo rodosina, ocho aminoácidos, encargados de mantener la estructura y función generales de estos receptores.

Estos receptores se clasifican en tres categorías, atendiendo a su señal de transducción y a su acción biológica:

- Receptores Relajantes: EP-2 y EP-4. Actúan acoplados a proteínas Gs, que activan a la adenilato ciclasa (AC) y median un incremento del AMPc, induciendo la relajación del músculo liso. (Honda A, 1993; Regan JW, 1994).
- Receptor Contráctil: EP-1. Media la acción de la PGE<sub>2</sub> que induce un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre. Este incremento es dependiente de la disponibilidad del Ca<sup>2+</sup> extracelular y va acompañado por un pequeña respuesta del fosfatidil inositol (Whatabe A, 1993). Esto sugiere que este receptor EP regula los canales de Ca<sup>2+</sup> a través de una proteína G no identificada.
- Receptor Inhibitorio: EP-3. Presenta varias isoformas por splicing alternativo de su extremo carboxilo terminal, de las cuales las más conocidas son: EP-3<sub>A</sub>, EP-3<sub>B</sub>, EP-3<sub>C</sub> y EP-3<sub>D</sub>. Inicialmente se creía que estos receptores estaban acoplados a proteínas Gi que producían una inhibición de la AC y una disminución del AMPc, provocando una inhibición de la relajación del músculo liso (Sugimoto Y, 1992). Otros autores han observado que la unión de la PGE<sub>2</sub> a estos receptores puede provocar un aumento en los niveles del AMPc y del fosfatidil inositol (Irie A, 1993). Sin embargo, a pesar de los trabajos existentes aún no se conoce el significado fisiológicos de las isoformas del receptor EP-3.

### 3.3 Las óxido nítrico sintasas (NOS).

El óxido nítrico (NO) se sintetiza en las células de mamíferos gracias a la intervención de una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Se conocen tres isoformas, dos de las cuales se expresan de forma constitutiva conocidas como cNOS (nNOS y eNOS) y una tercera que es inducible (iNOS). La nNOS fue originalmente purificada en el tejido neuronal, aunque también se localiza en otros tejidos, como el músculo esquelético. La eNOS se localiza en diferentes tejidos y células como endotelio vascular, miocardio, plaquetas e hipocampo. Finalmente se ha descrito la presencia de la isoforma inducible en macrófagos, músculo cardíaco, hepatocitos, glía, condrocitos, etc. (Abramson SB, 2001). La actividad de la enzima NOS está regulada a diferentes niveles y para que lleve a cabo su función necesita diferentes sustratos y cofactores:

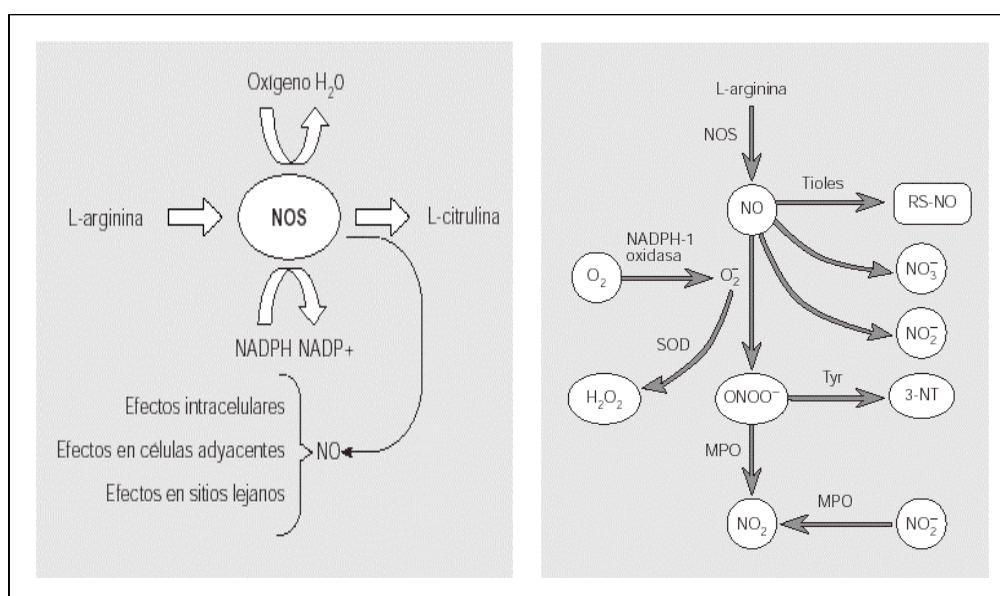
- Calcio y calmodulina. La síntesis de NO depende de la capacidad de cualquiera de las isoformas de NOS para unirse a la proteína reguladora de calcio, llamada calmodulina. Sin embargo, las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> necesarias para la activación de la iNOS son mucho más bajas que las que requieren cualquiera de las isoformas constitutivas (Nathan C, 1994).
- Cofactores de NOS. Todas las isoformas de NOS requieren la presencia de L-arginina, tetrahidrobiopterina (TBH), nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH), flavin adenina dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN) para la síntesis de NO.

Existen otras diferencias entre las isoformas de NOS en cuanto al tipo de respuesta y la duración de la misma. Las isoformas constitutivas presentan una respuesta inmediata, corta y la cantidad de NO que producen se encuentra en el rango de los pmoles. En cambio, la isoforma constitutiva, tienen una respuesta retardada y larga, produciendo NO en concentraciones mas altas (Nathan C, 1997).

### 3.4 El Oxido nítrico (NO).

El NO es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por la NOS. El NO es lábil y en presencia de oxígeno se metaboliza rápidamente a su forma inactiva, estable y definitiva, los nitritos ( $\text{NO}^2^-$ ) y los nitratos ( $\text{NO}^3^-$ ). (Stamler JS, 1992) (Figura 5).

La vida media del NO es breve (8-10 segundos), lo cual limita su campo de acción. Sin embargo, sus efectos biológicos pueden extenderse debido a la formación de productos estables y activos, cuando reacciona con proteínas y otras moléculas: el NO se puede unir al grupo hemo de la guanilato ciclasa estimulando la producción de GMPc; se puede transformar en peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) por reacción con el anión superóxido ( $\text{O}^2^-$ ) o también puede eliminarse por reacción con oxihemoglobina hasta formar nitratos (Figura 5).



**Figura 5: (A) Síntesis de NO.** El aminoácido L-arginina es el sustrato para la producción de NO y L-citrulina. La reacción catalizada por la enzima NOS requiere la presencia de oxígeno y NADPH. **(B) Metabolismo del NO.** El NO puede combinarse con aniones superóxido ( $\text{O}^2^-$ ) para formar iones de peroxinitrito altamente reactivos ( $\text{ONOO}^-$ ). Estos iones pueden causar nitrosilación de la tirosina (Tyr), llevando a la formación de 3-nitrotirosina (3-NT). El NO puede también combinarse con tioles como el glutatión o la albúmina para producir nitrosotioles (RS-NO), o ser metabolizado a nitrito ( $\text{NO}^2^-$ ) o nitrato ( $\text{NO}^3^-$ ). MPO: mieloperoxidasa; SOD: superóxido dismutasa.

Existen numerosos factores que determinan el papel dual fisiológico o fisiopatológico del NO. Entre ellos, uno de los más importantes es la concentración local del mediador: concentraciones pmolares de NO producidas por las isoformas constitutivas de la NOS son suficientes para que el NO lleve a cabo sus funciones fisiológicas. Sin embargo, concentraciones mayores del mediador producidas por la isoforma inducible van a estar implicadas en la respuestas proinflamatorias y en la destrucción de las células y tejidos adyacentes (Nathan C, 1997). Hay que recordar, que mientras una elevada producción de NO se asocia generalmente a daño tisular, el NO producido de forma constitutiva por el endotelio parece tener un papel protector en el sistema vascular, debido a la capacidad del mediador para inhibir la adhesión de los neutrófilos y plaquetas al endotelio, así como para disminuir la producción del anión superóxido en leucocitos (Abramson SB, 2001). Otras acciones antiinflamatorias del NO incluyen la inhibición de: degranulación de los mastocitos, la expresión de P-

selectina y la formación de las fibras de estrés de actina a los sitios de adhesión (Abramson SB, 2001).

En cuanto a las enfermedades articulares, el NO es un mediador claramente involucrado en la destrucción del cartílago articular en la OA a través de diferentes mecanismos (Abramson SB, 2001; Blanco FJ, 1995a; Pelletier JP, 2001a). El líquido sinovial procedente de las articulaciones humanas sanas contiene valores muy bajos de NO, a diferencia del procedente de pacientes con OA o AR que posee altas concentraciones de NO (Farrell AJ, 1992). Además la cantidad de NO producido por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de lesión del cartílago (Hashimoto S, 1998). De los tejidos que forman parte de la articulación, el cartílago es el tejido que tiene mayor capacidad para sintetizar y liberar NO. El cartílago artrósico expresa la iNOS y produce nitritos tras 72 horas en cultivo, en ausencia de estímulos como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (Attur MG, 2000; Amin AR, 1997) y se ha observado que los condrocitos de las zonas superficiales producen más NO que las células de las capas más profundas (Hayashi T, 1997). En cambio, el tejido sinovial humano tiene una escasa capacidad para sintetizar y liberar NO (Rediske JJ, 1994).

El NO puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz del cartílago, tal como colágeno y proteoglicanos. También puede aumentar la actividad de las MMP, incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reducir la síntesis de IL-1Ra, inhibir la proliferación e inducir apoptosis (López-Armada MJ, 2004). Por otro lado, se ha implicado al NO en la formación de osteofitos (Nishida K, 2001) y se ha visto que pueden inducir la mineralización del cartílago en la OA mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Johnson K, 2000). Por ello, debido a las propiedades eminentemente destructivas del cartílago articular, el NO puede ser un importante mediador de la lesión articular crónica en la OA.

### **3.5 Relación entre la PGE<sub>2</sub> y el NO.**

Diferentes trabajos han demostrado la existencia de una estrecha relación entre los mediadores de la inflamación NO y PGE<sub>2</sub> que pueden regular la homeostasis del tejido y contribuir al proceso fisiopatológico (Clancy R, 2000), aunque los resultados obtenidos son muy contradictorios y parecen depender del tipo celular, del microambiente presente y de la isoforma de la COX implicada. En este sentido, se ha observado que el NO incrementa la liberación de la PGE<sub>2</sub> mediada por la COX-1, pero disminuye la síntesis del mediador asociada a la COX-2 (Clancy R, 2000). Existen trabajos que demuestran que el tratamiento con inhibidores de la NOS disminuye la liberación de la PGE<sub>2</sub> al líquido sinovial en modelos experimentales de artritis y OA, lo que sugiere que parte de la protección del cartílago que se observa con estos tratamientos es debida a la modulación de las PG (De Mello SB, 1997; Pelletier JP, 1998). Estos resultados coinciden con trabajos previos en los que se demostró que la modulación de los niveles de NO o de la expresión de la NOS puede influir en la síntesis de las prostaglandinas a través de la alteración de la transcripción de los genes de la COX o la modulación de la actividad de la ciclooxigenasa (Salvemini D, 1993; Salvemini D, 1995). Además algunos autores han observado que la PGE<sub>2</sub> es capaz también de inhibir el incremento en la expresión de la iNOS y en la síntesis de NO inducido por el LPS en macrófagos (Marotta P, 1992). Sin embargo, en los condrocitos humanos normales el NO aumenta la síntesis de la PGE<sub>2</sub> mientras que la PGE<sub>2</sub> no tiene

ningún efecto en la producción de NO (Blanco FJ, 1995). En cambio, la producción de NO por el cartílago artrósico inhibe la producción de la PGE<sub>2</sub> (Amin AR, 1997). A pesar de estos efectos aparentemente contradictorios, está claro que existe una relación muy estrecha entre las vías de NOS y COX en situaciones patológicas y en la homeostasis normal de los tejidos. En enfermedades, como la OA, donde tanto la expresión de la iNOS como de la COX-2 están incrementadas, aquellas estrategias centradas en la regulación de ambas enzimas pueden ser beneficiosas. Sin embargo, el NO y la PGE<sub>2</sub> tienen efectos pro y antiinflamatorios, por lo que una completa depleción de alguno de los mediadores podría tener efectos negativos en la progresión de la enfermedad.

### 3.6 Las Metaloproteasas.

Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn<sup>2+</sup>, capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (Murphy G, 2002). Participan en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la migración celular, la cicatrización de heridas y la reabsorción de tejido. Sin embargo, una desregulación o activación de la expresión de la MMP conduce a situaciones patológicas, como metástasis tumoral, remodelación vascular y cardíaca, rotura de la placa aterosclerótica en síndromes coronarios agudos y enfermedades reumáticas como artritis y OA.

Las distintas MMP humanas presentan una organización estructural semejante:

- Dominio catalítico de unos 165 aminoácidos, con un sitio característico de unión a zinc.
- Prodominio implicado en el mantenimiento de la latencia enzimática.
- Secuencia señal implicada en la secreción de las proteasas.
- Dominio hemopexina que modula las interacciones con los sustratos y con los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP).

Sin embargo, más allá de esta organización estructural común existen variaciones que permiten la división de las MMP en seis subfamilias diferentes: colagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelinas (MMP-3 y -10), matrilisinas (MMP-7 y -26), matriz metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) y otras MMP (MMP-11, -12, -19, -20, -21 y -28) (revisado en Murphy G, 2002).

La actividad de las MMP está regulada a tres niveles: transcripción del gen, activación postraduccional de las proenzimas e inhibición por inhibidores endógenos específicos. Los mecanismos de regulación transcripcional de las MMP son muy complejos, pero su transcripción se induce notablemente en el tejido articular tras la acción de numerosos factores, entre los que destacan las citoquinas proinflamatorias, especialmente la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . Las rutas de transducción de señales que median la actividad de los reguladores transcripcionales de las MMP son también muy diversas, aunque entre ellas se encuentran los factores nucleares NF- $\kappa$ B y AP-1 y las MAPK (Vincenti MP, 2002). En cuanto a la regulación postraduccional, las MMP son secretadas como enzimas inactivas requiriendo la pérdida del prodominio implicado en el mantenimiento de la latencia enzimática para que puedan actuar sobre sus sustratos. La activación puede ocurrir intracelularmente, en la superficie celular por la acción de MT-MMP, en el espacio extracelular a través de la acción de otras proteasas o por otras MMP previamente activadas (Rannou F, 2006). Por

último, la actividad enzimática de estas enzimas está estrictamente controlada por sus inhibidores específicos conocidos como TIMP. Se han identificado tres formas diferentes de inhibidores de MMP en los tejidos de la articulación humana: TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 (Rannou F, 2006).

El rasgo principal de la OA es la destrucción progresiva de la matriz del cartílago, en la cual están muy implicadas las MMP. En la actualidad, sabemos que las colagenasas, las estromelinas y las gelatinasas son enzimas determinantes en el proceso de destrucción del cartílago articular (Pelletier JP, 2001a). Diferentes trabajos han demostrado la implicación de las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13 y de la estromelina MMP-3 en la destrucción del cartílago articular que sucede en la OA (Billinghurst RC, 1997; Freemont AJ, 1997). La MMP-1, la MMP-3 y la MMP-13 se encuentran presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA, en unos niveles bastante elevados en el caso de la MMP-1 y la MMP-3 (Lohmander LS, 1993; Yoshihara Y, 2000). También se ha demostrado que tanto en condrocitos como en sinoviocitos artrósicos se incrementa la expresión de la MMP-13 (Billinghurst RC, 1997; Walling HW, 2003). Mediante inmunohistoquímica se ha detectado la presencia de la MMP-1 y la MMP-3 en las zonas erosionadas del cartílago articular así como en la membrana sinovial procedente de articulaciones artrósicas (Murphy G, 2002). Aunque el papel de la MMP-3 es fundamental en el desarrollo de la OA, sólo las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13 son capaces de degradar la triple hélice del colágeno tipo II, la principal proteína estructural del cartílago. Es más, Billinghurst *et al.* demostraron que en los condrocitos artrósicos se incrementaban los niveles de la MMP-13 y que la degradación del colágeno tipo II que se observaba en el cartílago parecía estar correlacionada con la actividad de la colagenasa (Billinghurst RC, 1997). Finalmente varios grupos han sugerido la idea de que un desequilibrio entre los niveles de las MMP y los TIMP es fundamental en la progresión de la OA (Martel-Pelletier J, 1994; Dean DD, 1989). El cartílago articular y los condrocitos artrósicos son capaces de sintetizar los tres tipos de inhibidores descritos, TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3. Sin embargo, se ha observado tanto en el cartílago, como en el líquido y el tejido sinovial artrósico un desequilibrio entre la concentración de MMP y TIMP (Su S, 1999).

#### **4. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ARTROSIS.**

En ausencia de una cura definitiva la terapia de la OA se ha basado tradicionalmente en el control de la sintomatología de la enfermedad centrándose en estrategias que redujeran el dolor y mejoraran la movilidad. Las modalidades terapéuticas en el tratamiento de la OA son muy numerosas incluyendo tanto tratamientos farmacológicos como no farmacológicos. Entre los farmacológicos se incluyen los analgésicos, AINE, opiáceos, SYSADOA y los corticoides.

##### **4.1 Analgésicos.**

El paracetamol continúa siendo el analgésico típico y constituye la primera línea de tratamiento sintomático. El paracetamol no es un antiinflamatorio, aunque su eficacia analgésica es equivalente a la de los AINE. El paracetamol presenta escasos efectos secundarios a dosis terapéuticas, pero si se utiliza a dosis superiores puede aparecer toxicidad hepática.

## 4.2 Inhibidores de la COX.

Los AINE son un grupo heterogéneo de compuestos, generalmente ácidos débiles, cuyo mecanismo común de acción se conoce desde 1971, cuando se describieron sus efectos sobre la síntesis de las PG (Vane JR, 1971). Los AINE tienen efectos analgésicos, antipiréticos, antiagregantes y antiinflamatorios. El principal mecanismo de acción de estos medicamentos radica en la inhibición de la COX, lo que provoca un bloqueo en la fase inicial de la cascada proinflamatoria de las acciones mediadas por los eicosanoides (Vane JR, 1971). Los primeros AINE que se desarrollaron eran inespecíficos, inhibiendo tanto a la COX-1 como a la COX-2. Estos fármacos pueden producir una inhibición de la enzima reversible (indometacina (IND) e ibuprofeno) o irreversible (ácido acetil salicílico) al competir con el sustrato por el centro activo. (Vane JR, 1996). Algunos AINE poseen otros efectos que pueden contribuir a la eficacia antiinflamatoria, como es el caso del diclofenaco (DCF) y la IND, que interfieren en la migración de los neutrófilos hacia los tejidos disminuyendo en estas células la expresión de la selectina L, es decir, inhibiendo la interacción de los neutrófilos con el endotelio activado (Díaz-González F, 1995). Otro AINE no específico empleado en el tratamiento de la OA es el aceclofenaco (ACF) que parece no ser capaz de inhibir a la COX pero que interfiere directamente en la síntesis de las prostaglandinas tras ser metabolizado en su metabolito activo, el DCF.

El tratamiento con los AINE presenta una serie de efectos adversos, sobre todo en la mucosa gástrica y en la función renal, que hay que considerar. Por este motivo se desarrollaron inhibidores selectivos de la COX-2 esperando que tuvieran unas acciones terapéuticas similares a los inhibidores no selectivos pero sin causar los efectos adversos citados anteriormente.

CLASIFICACIÓN DE LOS AINE	
Ácido Acetilsalicílico	
Ácido Fenilacético:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diclofenaco (DCF).</li> <li>• Aceclofenaco (ACF).</li> </ul>
Ácido Indolacético:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indometacina (IND).</li> </ul>
Oxicams:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piroxicam.</li> <li>• Meloxicam (MXC).</li> </ul>
Ácido Propiónico:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ibuprofeno.</li> <li>• Flurbiprofeno.</li> <li>• Naproxeno.</li> <li>• Ketoprofeno.</li> </ul>
COXIBs:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Celecoxib (CBX).</li> <li>• Valdecoxib.</li> <li>• Rofecoxib.</li> </ul>

Tabla 1: Clasificación de los AINE más utilizados.

El MXC fue uno de los primeros inhibidores preferenciales de COX-2 disponibles. Es un AINE de la familia de los oxicam con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Su selectividad se ha definido en estudios cinéticos, comparando su capacidad relativa de inhibir ambas

isoformas con la de un gran número de AINE. En estos estudios, con el 80% de inhibición de la COX-2, el MXC bloquea el 25% de la actividad de la COX-1, mientras que un inhibidor no selectivo como el DCF bloquea alrededor del 65% de actividad de la COX-1 (Bertolini A, 2001).

La caracterización de la estructura tridimensional de las ciclooxigenasas mediante estudios cristalográficos y de fluorescencia ha permitido el desarrollo de los COXIBs, los cuales son capaces de inhibir a la COX-2 sin modificar la actividad de la COX-1. El celecoxib (CBX) fue el primer COXIB aprobado para el tratamiento de la OA y de la artritis reumatoide. Este fármaco es capaz de mejorar el dolor y la movilidad de forma similar a los AINE convencionales, presentando sin embargo menos complicaciones gastrointestinales y se ha demostrado que el CBX es 375 veces más selectivo para la COX-2 que para la COX-1 (Clemett D, 2000).

### 4.3 Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la OA (SYSADOA).

A pesar del uso generalizado de los AINE y los COXIB en el control de la inflamación y el dolor que se observa en la OA, y del importante papel que desempeña la PGE<sub>2</sub> en el desarrollo de la enfermedad, el uso crónico de inhibidores de la COX no parece atenuar la destrucción del cartílago articular en la OA, razón por la cual se ha desarrollado un grupo nuevo de compuestos denominados SYSADOA. Estos fármacos son capaces de paliar los síntomas de la OA y parece que también retardan su progresión. Se caracterizan por una acción de aparición lenta (6-8 semanas después del inicio del tratamiento) y sus efectos pueden prolongarse durante un período de tiempo significativo tras el cese del tratamiento. Los SYSADOA incluyen compuestos como la glucosamina (N-Acetil Glucosamina (AcG), Sulfato de Glucosamina (SG) e Hidrocloruro de Glucosamina (HG)), el Condroitín Sulfato (CS), la Diacereína (DC) y el Ácido Hialurónico. La Glucosamina y el CS se empezaron a utilizar en un intento de recomponer los componentes que forman parte de la matriz extracelular del cartílago (Fajardo M, 2005). Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los SYSADOA en el tratamiento de pacientes artrósicos. Pero debido a que no todos los trabajos han proporcionado resultados favorables existe mucha controversia sobre el papel de estos fármacos como agentes modificadores de la enfermedad. La DC reduce el estrechamiento del espacio articular en pacientes con OA de rodilla, aunque no parece modificar los síntomas de la OA (Dougados M, 2001). Richi *et al.* realizaron una revisión de los estudios realizados en pacientes con OA de rodilla y observaron que la glucosamina mejoraba tanto las medidas sintomáticas como las estructurales mientras que el CS solo era capaz de mejorar la sintomatología (Richy F, 2003). Sin embargo otro estudio demostró que el CS disminuía la probabilidad de que los pacientes desarrollaran OA erosiva (Verbruggen G, 2002). Recientemente, se han obtenido interesantes resultados en lo que se refiere al dolor asociado a la enfermedad procedentes de dos ensayos multicéntricos, los estudios GAIT y GUIDE (Clegg DO, 2006; Herrero-Beaumont G, 2005) que sugieren que los diferentes compuestos de glucosamina podrían tener efectos distintos (Hochberg MC, 2006).

- **El Condroitín sulfato:** el CS es un proteoglicano formado por sulfato de galactosamina y ácido glucurónico con diferentes efectos biológicos. Parece que su eficacia en la OA se debe no sólo a su actividad antiinflamatoria sino también a sus efectos anabólicos y anticatabólicos en la matriz del



cartílago, como sería la modulación en la síntesis de proteoglicanos y AH, la inhibición de algunas enzimas proteolíticas y la inhibición de la síntesis del NO (Verbruggen G, 2006).

- **La Glucosamina:** La Glucosamina es un amino-monosacárido esencial para la síntesis de glicolípidos, glicoproteínas y GAG, componentes esenciales de todos los tejidos conectivos. Existen diferentes compuestos de glucosamina: N-Acetil Glucosamina (AcG), Sulfato de Glucosamina (SG) e Hidrocloruro de Glucosamina (HG). El SG presenta una actividad anabólica (incrementa la síntesis de proteoglicanos) y disminuye la actividad catabólica (inhibe la MMP, la agreganasa y los radicales superóxido), por lo que podría tener un efecto sobre la reparación y el mantenimiento de la estructura del cartílago (Verbruggen G, 2006).
- **La Diacereína:** La DC es un derivado de la antraquinona, y su metabolito activo, la reína, presenta propiedades antiinflamatorias y analgésicas. La DC es capaz de inhibir la producción de IL-1 $\beta$  inducida por lipopolisacárido en el tejido sinovial y el cartílago, disminuir la liberación de NO y aumentar los niveles de IL-1Ra (Yaron M, 1999).

#### 4.4 Glucocorticoides.

Los glucocorticoides constituyen uno de los grupos farmacológicos más utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Se pueden clasificar en función de su vida media biológica: corta (cortisona), intermedia (metilprednisona) y prolongada (dexametasona). A dosis farmacológicas, estos fármacos presentan acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras. Estimulan la síntesis de la lipocortina I, proteína que bloquea la acción de la fosfolipasa A, con lo que provocan la inhibición de la producción intracelular de PG y leucotrienos. Además, inhiben la síntesis de algunas enzimas proinflamatorias como las colagenasas, la elastasa y el activador del plasminógeno. También disminuyen la expresión de diversas moléculas de adhesión (selectina E e ICAM-I) y modulan la apoptosis linfocitaria (Nolla Solé JM, 1999).

## **II. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en la inflamación sinovial y en la expresión de genes proinflamatorios en la membrana sinovial de pacientes con artrosis de rodilla avanzada. Para ello utilizamos dos inhibidores de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, uno inespecífico de la COX, el ACF, y otro selectivo de la COX-2, el CBX y estudiamos la expresión y síntesis de los diferentes componentes de la ruta de las PG y del NO. También analizamos la expresión de citoquinas proinflamatorias y de las enzimas implicados en la degradación de la matriz extracelular.
2. Estudiar el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena sobre el estado catabólico de los condrocitos y sinoviocitos humanos en cultivo. Para ello comparamos de forma simultánea el efecto de diferentes fármacos anti-OA como los AINE (MXC, DCF, IND y CBX), los SYSADOA (SG, DC, CS) y de otros azúcares biológicos como (HG, N-AcG y NAC) y de glucocorticoides como la MP sobre la activación de diferentes mediadores proinflamatorios y estructurales inducidos por citoquinas proinflamatorias en condrocitos y sinoviocitos procedentes de pacientes con OA.
3. Estudiar uno de los posibles mecanismos que podría ser responsable de los cambios observados en la expresión y síntesis de los mediadores proinflamatorios y estructurales estudiados. Para ello estudiamos el efecto de los AINE, de los SYSADOA y de otros azúcares biológicos sobre la activación del factor nuclear NFκB inducida por IL-1β en condrocitos y sinoviocitos humanos en cultivo.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. ESTUDIOS EN PACIENTES.

En este estudio se incluyeron 30 pacientes que presentaban evidencias clínicas y radiográficas correspondientes a artrosis de rodilla de acuerdo con los Criterios de la Sociedad Americana de Reumatología (ACR) para las clases funcionales III y IV al menos durante 6 meses antes del inicio del estudio. Todos los pacientes del estudio estaban en lista de espera para la realización de una artroplastia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica del Hospital Virgen de la Cinta (Tortosa, Tarragona, España). A los pacientes se les ofreció seguir un tratamiento con fármacos antiinflamatorios hasta la cirugía. Aquellos que aceptaron el tratamiento con los AINE fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos para recibir celecoxib (CBX) (200 mg/24h) o aceclofenaco (ACF) (100 mg/12h) durante un tiempo mínimo de tres meses. El tratamiento comenzó después de un periodo de lavado de una semana. Aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio pero prefirieron no ser tratados con los AINE se incluyeron en el grupo control (CONTROL). Se utilizó el acetaminofeno (500 mg max.) en todos los pacientes como fármaco de rescate para controlar el dolor.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: negativa o imposibilidad del paciente a participar en el estudio, mujeres embarazadas, diagnosis previa de patología gastrointestinal, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, diabetes insulino dependiente, enfermedades cardiovasculares, neoplasias, alteraciones de la coagulación sanguínea, enfermedades neurológicas e hipersensibilidad a los AINE. Así mismo se excluyeron aquellos pacientes que hubieran recibido en los tres meses previos a la inclusión en el estudio corticosteroides o ácido hialurónico intraarticular. También se excluyeron aquellos pacientes con historia de abuso de alcohol o drogas así como aquellos que estaban siguiendo un tratamiento con litio o anticoagulantes orales.

Los pacientes fueron evaluados tres veces: en el momento del reclutamiento (T0), después del periodo de lavado (T1) y dos o tres días antes de la cirugía (T2). Se midieron los síntomas y la capacidad funcional de los pacientes siguiendo el índice de artrosis de las universidades de Western Ontario y McMaster (WOMAC) (Bellamy N, 1998), el cual evalúa el dolor, la rigidez y la actividad física y social. Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

El día antes de la cirugía se obtuvieron las muestras de suero que se almacenaron a  $-20^{\circ}$  C para su posterior análisis. Durante la cirugía se recogieron muestras de líquido sinovial (LS) y se almacenaron a  $-70^{\circ}$  C hasta su análisis. Además se recogieron muestras de cartílago articular del cóndilo femoral y de membrana sinovial. Parte de las muestras de ambos tejidos se congelaron en nitrógeno líquido para llevar a cabo estudios de expresión génica y de síntesis proteica. Dado el carácter parcheado del daño articular en la OA, en estos estudios se utilizaron al menos tres porciones diferentes de membrana sinovial y cartílago articular para evitar la obtención de resultados sesgados. Además, una porción de los dos tejidos se fijó durante 24 h en un tampón frío de paraformaldehído al 4% y se procesó para ser incluida en parafina.

## 2. CULTIVOS CELULARES.

### 2.1 Cultivo celular de condrocitos.

Los condrocitos se obtuvieron del cartílago articular procedente de conejos New Zealand sanos o de pacientes con OA a los que se les practicó una artroplastia total de rodilla por cirugía convencional, después de obtener su consentimiento informado. El cartílago articular procedente del cóndilo femoral y del platillo tibial se diseccionó en un medio estéril. Los condrocitos se obtuvieron después de digerir el cartílago secuencialmente con pronasa (Roche, 10 g/L) durante 30 minutos y colagenasa tipo IV (Sigma, 1 g/L) durante 6 horas. La reacción se paró añadiendo medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, BioWhittaker) suplementado con un 10% de STF (suero de ternera fetal, BioWhittaker), 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomycin y 2 mmol/L de glutamina (BioWhittaker). Las células se resuspendieron en medio DMEM con 10% STF, se sembraron en placas de 100x20mm y se incubaron a 37°C en una estufa humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron con células que sufrieron 1 ó 2 pases y que fueron depleccionadas durante 48 horas antes de la realización de los experimentos en medio DMEM al 0% de STF.

Las células utilizadas en los experimentos constituían una población homogénea de células adheridas y con un fenotipo típico de condrocitos. Para la caracterización celular se realizó una tinción con Safranina O para la determinación de glicosaminoglicanos sulfatados y azul alcian-PAS para glicosaminoglicanos totales. También se confirmó por inmunohistoquímica la presencia de colágeno tipo II y agrecano en los cultivos de condrocitos (Reginato AM, 1994).

### 2.2 Cultivo celular de sinoviocitos.

Las muestras de membrana sinovial se obtuvieron de pacientes con OA a los que se les practicó una artroplastia total de rodilla por cirugía convencional, después de obtener su consentimiento informado. Las membranas sinoviales se mantuvieron 1 hora en suero salino con gentamicina (0.4 u/ml) en un baño a 37° C. Los sinoviocitos se obtuvieron tras tres digestiones secuenciales de 15 minutos cada una con tripsina (Roche, 1.25 mg/ml, pH8) a 37° C en un baño orbital en agitación. La reacción se paró añadiendo medio RPMI 1640 (BioWittaker) suplementado con un 20% de STF (BioWhittaker), 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomycin, 2 mmol/L de glutamina (BioWhittaker) y 1% de ITS (insulin-trasferrin sodium-selenite, Sigma). Posteriormente se recogieron las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI con 20% de STF. Los sinoviocitos se incubaron en placas 100x20mm a 37° C en una estufa humidificada en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron con células que sufrieron entre 6 y 12 pases que se mantuvieron en medio RPMI al 0% de STF durante 48 horas antes de la realización de los experimentos.

Las células utilizadas en los experimentos constituían una población homogénea de células adheridas y con un fenotipo típico de fibroblastos, correspondiente a sinoviocitos tipo B. Para la caracterización celular se realizó una tinción de esterazas que resultó ser negativa excluyendo contaminación de monocitos/macrófagos o granulocitos en nuestras muestras. Además mediante estudios de inmunohistoquímica se confirmó que las células presentaban tinción negativa tanto para KP-

1, anti-CD68 (Dako) y anti-Factor VII, específico para células endoteliales (Biomed), confirmando la presencia de una única población celular formada exclusivamente por células de estirpe fibroblástica (Wilkilson LS, 1992).

### 2.3 Fármacos empleados en los estudios *in vitro*.

En cada experimento las células se crecieron y se mantuvieron quiescentes durante 48 horas en medio DMEM o RPMI sin suero, y posteriormente se estimularon durante diferentes periodos de tiempo con IL-1 $\beta$  (10 u/ml, Immunogenex). Cuando se indica, las células se preincubaron durante 60 minutos con N-acetil glucosamina (AcG, 2mM, Sigma), sulfato de glucosamina (SG, 0.02 mM, 0.2 mM ó 2 mM, forma cristalina, Rottapharm), hidrocloreuro de glucosamina (HG, 2 mM, Sigma), diacereína (DC, 10<sup>-5</sup> M, Sigma), condroitin 6-sulfato (C-6S, 2 mM, Sigma), N-acetil cisteína (NAC, 2 mM, Sigma), 6 $\alpha$ -metilprednisona (MP, 10<sup>-6</sup>M, Sigma), celecoxib (CBX, 10<sup>-6</sup>M, Pfizer), diclofenaco (DCF, 10<sup>-6</sup>M, Sigma), meloxicam (MXC, 10<sup>-6</sup>M, Boehringer Ingelheim), indomethacina (IND, 10<sup>-6</sup>M, Sigma), N-acetil manosamina (AcM, 2 mM, Sigma) e hidrocloreuro de manosamina (HM, 2 mM, Sigma). Los compuestos se mantuvieron en el medio durante todo el periodo de incubación.

## 3. TÉCNICAS EMPLEADAS.

### 3.1 Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

#### 3.1.1 Preparación de extractos nucleares y citosólicos.

Los extractos nucleares y citosólicos se obtuvieron según se ha descrito previamente (Gomez-Garre D, 2001). Tras el periodo de incubación adecuado, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en tampón A [10 mmol/L HEPES pH 7.8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 mmol/L ditioneitol (DTT), y 1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF)] y se homogeneizaron. Los núcleos y las fracciones citosólicas de las células se separaron por centrifugación a 1000 g durante 10 min. Las fracciones citosólicas (sobrenadantes) se almacenaron a -80°C para posteriormente realizar la medida de Lk $\beta$ . Los extractos nucleares (precipitado) se lavaron dos veces en tampón A y se resuspendieron en el mismo tampón, añadiéndole KCl a una concentración final de 0.39 mol/L. Los núcleos se extrajeron por precipitación durante 1 hora a 4°C y posterior centrifugación a 12.000 g durante 60 minutos. Los sobrenadantes se dializaron en tampón C (50 mmol/L HEPES pH 7.8, 50 mmol/L KCl, 10% glicerol, 1 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L EDTA, y 1 mmol/L DTT) y se centrifugaron antes de guardarse a -80°C. La concentración de proteínas totales de las muestras se midió por el método del ácido bicinchoninico (BCA).

#### 3.1.2 EMSA.

La actividad de los factores de transcripción se determinó según se ha descrito previamente (Gomez-Garre D, 2001). Brevemente, los oligonucleótidos que contienen las secuencias consenso de unión para los factores nucleares NF- $\kappa$ B y AP-1, (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') y (5'-

CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') respectivamente, se marcaron radiactivamente con [32P] ATP utilizando una enzima T4 polinucleótido quinasa (Promega). Los extractos nucleares de las células (5 µg) se equilibraron durante 10 minutos en tampón de unión [4% glicerol, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, y 50 g/ml de poli(dI-dC); Pharmacia LKB], después se añadió el oligo marcado (0.35 pmol) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para asegurar la especificidad de la reacción, realizamos controles negativos del ensayo sin extractos celulares y ensayos de competición con un exceso de 100 veces de oligo sin marcar al que se le añadió el extracto nuclear y la misma cantidad de oligo marcado. En los ensayos de competición, el oligo no marcado se añadió a la mezcla de reacción 10 minutos antes de añadir el oligo marcado. Extractos nucleares procedentes de células Hela se utilizaron como control positivo de la reacción. Para los ensayos de super retardo, se añadió 1 µg de cada anticuerpo (p50 y p65, ambos de Santa Cruz Biotech) a la mezcla de reacción y se incubó con el extracto nuclear durante 1 hora, tras lo cual se añadió el oligo marcado. La especificidad de estos anticuerpos se aseguró por ensayos de Western blot. La reacción se paró añadiendo a la mezcla tampón de carga para geles de electroforesis (250 mmol/L Tris-HCl, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% xileno cianol, y 40% glicerol) y se corrieron en un gel de electroforesis no desnaturante al 4% en tampón Tris-Borato. El gel se secó y se expuso a películas de rayos-X.

### 3.2 Inmunocitoquímica.

Los condrocitos se crecieron en portaobjetos de cultivo de 8 pocillos (Costar). Para estudiar las proteínas que forman el complejo NFκB, las células quiescentes se incubaron con 10 u/ml de la IL-1β en presencia o ausencia de SG (2 mM) durante 60 minutos. Tras la incubación, las células se lavaron, se fijaron en metanol/acetona (50:50 v/v) durante 1 h a -20° C y se trataron con triton X-100 al 0.1% durante 1 minuto en hielo, para permeabilizar las membranas nucleares. Los condrocitos se incubaron después con suero no inmune de cabra al 6% y albúmina de suero bovino al 4% en tampón fosfato salino (PBS) (9.1 mmol/L fosfato sódico dibásico, 1.7 mmol/L fosfato sódico monobásico, 150 mmol/L de NaCl, pH 7.4) durante 1 hora a 37° C. Los anticuerpos frente a las subunidades p50 y p65 (10 µg/ml) realizados en conejo (Santa Cruz Biotech) se utilizaron como anticuerpos primarios, y una dilución 1/200 del anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con FITC se utilizó como anticuerpo secundario (Sigma). Los controles se incubaron con suero de conejo no inmune o con el anticuerpo secundario únicamente. Las preparaciones se montaron en solución de glicerol y se examinaron al microscopio. Las imágenes que se observan están realizadas e impresas a tiempos de exposición equivalentes.

### 3.3 Western Blot.

Para la determinación de los niveles de la subunidad inhibitoria IκBα, las fracciones celulares citosólicas se obtuvieron como se ha descrito en los apartados anteriores. Para establecer los niveles de MMP-1 y MMP-13 en el sobrenadante celular de condrocitos y sinoviocitos, las células quiescentes se incubaron en placas de 24 pocillos en 300 µl de medio. Tras el período de incubación se recogieron los sobrenadantes celular que fueron almacenados a -80° C hasta su posterior análisis. Para la medida de COX-1, COX-2, TNF-α, IL-1β, iNOS, MMP-1 y MMP-13, las células o el tejido sinovial se



homogeneizaron en tampón de lisis enfriado previamente [1% Nonidet P-40 (Sigma); 0.5% SDS, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, y 1 mmol/L PMSF en PBS]. El lisado celular se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos dos veces. La concentración de proteínas totales se determinó por el método BCA.

Cantidades similares de proteínas de todas las muestras se corrieron en un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de polivinilideno (Millipore). Las membranas se bloquearon posteriormente con un tampón 0.1 mmol/L Tris, pH 7.4, y 0.1 mmol/L NaCl que contenía 0.3% de Tween-20 y 6% de leche desnatada, durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos anti I $\kappa$ B $\alpha$ , anti COX-1, anti COX-2 (ambos de Santa Cruz Biotech.), anti MMP-1 (Chemicon), anti MMP-13 (Calbiochem), anti TNF- $\alpha$  (PeproTech), anti IL-1 $\beta$  (MBL) o anti iNOS (Affinity BioReagents) a 4°C. Después de lavar, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante incubación de las membranas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa utilizando un kit quimioluminiscente (ECL, Amersham) para detectar la señal. En los experimentos en los que se midieron las proteínas celulares totales para asegurar que se cargaron cantidades iguales de proteínas, también hibridamos las membranas con un anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina (Sigma).

### 3.4 Medida de PGE<sub>2</sub>.

Se recogió LS de los pacientes en tubos con EDTA. Después de descongelarlo, el LS se trató con hialuronidasa (Boehringer) durante 1 h a 37° C. Se centrifugaron los tubos y se recogieron los sobrenadantes que se utilizaron para la determinación de PGE<sub>2</sub>. En cuanto a las células, el medio de cultivo de los condrocitos o de los sinoviocitos (cultivados en placas de 96 pocillos, a 50.000 células/pocillo en 150  $\mu$ l de medio) se recogió tras el periodo de incubación y se guardó a -80° C hasta el análisis de PGE<sub>2</sub>. La concentración de PGE<sub>2</sub> se determinó en el LS o en el medio de cultivo mediante un inmunoensayo enzimático (EIA) (Assay Designs Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.5 Medida de Nitritos.

Para la determinación de los niveles de nitritos, las células quiescentes se incubaron durante 24 horas con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) sola o con los fármacos utilizados en cada caso. Al finalizar el periodo de incubación, se recogió el medio de cultivo procedente de los cultivos de condrocitos o sinoviocitos (cultivados en placas de 24 pocillos en 300  $\mu$ l de DMEM 0% o RPMI 0% respectivamente) y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

La cuantificación de nitritos en el medio de cultivo o en el líquido sinovial de los pacientes se llevó a cabo por el método de Griess (Iwanaga T, 2000). Brevemente, 50  $\mu$ l del medio de cultivo celular o de LS se incubaron con 50  $\mu$ l de reactivo de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamide dihydrochloride in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro y se calculó la concentración de las muestras utilizando una curva estándar realizada con diluciones seriadas de una solución de nitrito sódico (Fluka).

### 3.6 Extracción de ARN total.

El ARN total se extrajo de tejido y de células en cultivo mediante el método de fenol-cloroformo en medio ácido (Chomczynski P, 1987). La cuantificación del ARN se realizó por medida de absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 mg/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre la absorbancia 260 y 280 nm era cercana a 2, indicando la ausencia de contaminación proteica.

### 3.7 Estudios de expresión génica por ensayo de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para realizar los estudios de RT-PCR, se necesitaba 100 ng de ARN que se transcribió a cDNA, y éste se sometió a sucesivos ciclos de amplificación en presencia de  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham), siguiendo las instrucciones de un sistema comercial (Access RT-PCR System kit; Promega). Este método permitía la presencia en el mismo tampón de dos enzimas envueltas en dichos procesos, la transcriptasa inversa del virus *Myeloblastis* de aves y la ADN polimerasa termoestable de *Termus flavus*.

GEN	Cebadores: (s) sentido (as) antisentido	Fragmento amplificado	C.Amplificación T <sup>a</sup> Nº de ciclos
COX-2 (humano y conejo)	(s): 5'- TCTTTGCCAGCACTTCA - 3' (as): 5'- CCATTCAGGATGCTCCTGTT - 3'	371 pb	58°C 25 ciclos
EP-1 (conejo)	(s): 5'- GCGGCTGGCGCCAGGC- 3' (as): 5'- CACCCAAGGGTCCAGGATCT-3'	464 pb	57°C 30 ciclos
EP-4 (conejo)	(s): 5'- GTTCATCTTCGGGGTGGTGG- 3' (as): 5'- TGGCGAGGATGAGGAAGGAG-3'	515 pb	63°C 36 ciclos
mPGES-1 (humano)	(s): 5'- CCAGCCAATCTAGAGGCAAG - 3' (as): 5'- GCCTTGCTTCCACAGAGAAC -3'	413 pb	62°C 34 ciclos
GAPDH (humano y conejo)	(s): 5'- ATTGCATCCTGCACCACCAA- 3' (as): 5'-GTAGCCATATTCATTGTCATA-3'	515 pb	54°C 22 ciclos

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para la detección de diferentes genes en el ARNm de condrocitos humanos y de conejo.

Los ciclos de amplificación de los fragmentos de PCR para los diferentes genes estudiados así como para el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) consistió en: 1

minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a una temperatura que dependía de la longitud y el contenido C+G de cada cebador, y 2 minutos de extensión a 68°C. El número óptimo de ciclos se eligió basándonos en experimentos iniciales en los que se estableció el rango lineal de la reacción. Los cebadores fueron diseñados de acuerdo con las secuencias genómicas encontradas en la base de datos Genbank. Las condiciones óptimas de alineamiento, así como las secuencias de los cebadores se detallan en la tabla 2.

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador (Perkin Elmer Cetus). Posteriormente, alícuotas de cada reacción de PCR se separaron por tamaño en un gel de acrilamida al 4%. Los geles se secaron y se expusieron para autorradiografía en películas X-OMAT AR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Las autorradiografías se analizaron en un densitómetro bidimensional (Molecular Dynamics). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la expresión de la enzima GAPDH, utilizada como control interno.

### 3.8 Estudios de expresión génica por PCR a tiempo real.

Mediante el kit ADNc Archive (Applied Biosystems), se retrotranscribió 1mg del ARN total, de la membrana sinovial de los pacientes o de los condrocitos humanos procedentes de cultivos celulares, para obtener ADNc total utilizando 2.5 u/ml de una transcriptasa reversa durante 2 h a 37° C en un volumen total de 50 µl. Posteriormente se almacenó el ADNc a -20° C hasta su posterior análisis. Como controles negativos se utilizaron muestras no retrotranscritas. La cuantificación del ARN específico se realizó usando un equipo de PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el Sistema de Detección de secuencia ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Los cebadores específicos se marcaron con un marcador fluorescente (FAM) en el extremo 5', y las sondas TaqMan FAM específicas para COX-1, COX-2, IL-1β, TNF-α, EP-1, EP-2, EP-3, EP-4 e iNOS se adquirieron de Applied Biosystems. También se utilizó un ensayo prediseñado de ARN ribosomal 18S (ARNr) (Applied Biosystems) como control endógeno. Las reacciones TaqMan se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía: los cebadores, la sonda TaqMan marcada con FAM (o con VIC para los controles internos), y 12.5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para realizar la PCR a tiempo real se utilizó el programa del Sistema de Detección de secuencia ABI Prism 7500 (95° C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos en los que se repetían los dos pasos de la PCR, desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y unión/extensión a 60° C durante 1 minuto). Después de comprobar que la eficacia de la reacción de amplificación para todos los genes estudiados, así como para el control endógeno de ARNr 18S fue equivalente, se calcularon las diferencias utilizando el ciclo umbral (Ct) y se usó el método del Ct comparativo para la cuantificación relativa. El ARNm de los diferentes genes estudiados se normalizó con respecto al ARNr 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente o punto del experimento para la expresión de cada gen se normalizó con respecto al valor calibrador (se eligió uno de los pacientes del grupo de CBX como calibrador=1 y en el caso de los experimentos *in vitro*, se utilizó el punto no estimulado como calibrador). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### 3.9 Estudios histopatológicos del cartílago articular de pacientes.

Las muestras de cartílago articular procedentes del cóndilo femoral inferior de los pacientes incluidos en el estudio se decalcificaron en una solución de EDTA (EDTA 0.07%, tartrato NaK 0.014%, HCl 9.92 ml/100 ml de agua destilada) durante un mes y medio y a continuación se incluyeron en parafina. El cartílago articular de los pacientes se dividió en dos zonas, en función de las alteraciones macroscópicas observadas en el tejido, la primera con mayor grado de alteraciones (zona A) y una segunda zona que presentaba un menor grado de lesión (zona B). Para la realización de los estudios histopatológicos ambas zonas se cortaron en secciones de 4 µm de grosor y a continuación se tiñeron con hematoxilina-eosina y azul alcian. El grado de lesión del tejido fue evaluado por dos observadores independientes de forma ciega y de acuerdo a la escala publicada por Mankin (Mankin HJ ,1971). Esta escala evalúa las alteración morfológicas presentes en el cartílago articular independientemente de su etiología, analizando cuatro características del cartílago que se encuentran alteradas en la OA: estructura, celularidad, tinción de la matriz e integridad de la limitante basófila. Estas cuatro subescalas se evalúan independientemente tal y como se muestra en la tabla 3. La puntuación total se obtiene tras la suma de la puntuación obtenida en cada una de las subescalas, siendo la puntuación máxima 14 puntos.

Subescalas	Alteraciones	Puntuación
<b>ESTRUCTURA</b>	• Normal.	0
	• Irregularidades en la superficie.	1
	• Irregularidades en la superficie y pannus.	2
	• Hendiduras hasta la zona de transición.	3
	• Hendiduras hasta la zona radial.	4
	• Hendiduras hasta la zona calcificada.	5
	• Desorganización completa.	6
<b>CELULARIDAD</b>	• Normal.	0
	• Hiper celularidad difusa.	1
	• Clones.	2
	• Hipocelularidad.	3
<b>TINCIÓN DE LA MATRIZ</b>	• Normal.	0
	• Reducción leve.	1
	• Reducción moderada.	2
	• Reducción severa.	3
	• Sin tinción.	4
<b>INTEGRIDAD DE LA LIMITANTE BASÓFILA</b>	• Intacta	0
	• Cruzada por vasos	1

Tabla 3. Escala de Mankin para la valoración histopatológica del cartílago articular (Mankin HJ ,1971).

### 3.10 Estudios histopatológicos de la membrana sinovial de pacientes.

Las muestras de membrana sinovial procedentes de los pacientes incluidos en el estudio se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4 µm de grosor. Para los estudios de microscopía óptica estos cortes se tiñeron con hematoxolina-eosina y tricómico de Masson. La sinovitis de cada muestra fue evaluada por dos observadores independientes de forma ciega y de acuerdo a la escala publicada por Kreen (Krenn V, 2002). Esta escala evalúa todo tipo de alteración morfológica de la membrana sinovial independientemente de su etiología, dividiendo la membrana en tres compartimentos, íntima, estroma e infiltrado celular, que se evalúan independientemente tal y como se muestra en la tabla 4. La puntuación máxima (Índice de sinovitis global) sería entonces de 9 puntos. En enfermos con OA, lo habitual es que la membrana sinovial se caracteriza por una hiperplasia moderada, un aumento del estroma y la presencia de un infiltrado entre leve y moderado, por lo que habitualmente se alcanzan puntuaciones en esta escala de sinovitis global entre 3 y 6 puntos.

Subescalas	Alteraciones	Puntuación
<b>INTIMA</b>	• Baja densidad celular, una o dos filas.	0
	• Hiperplasia media o focal.	1
	• Hiperplasia difusa o áreas puntuales de hiperplasia severa.	2
	• Hiperplasia difusa notable.	3
<b>ESTROMA</b>	• Intersticio normal.	0
	• Cambios fibróticos puntuales en la subíntima.	1
	• Incremento de la matriz intersticial y de la vascularización.	2
	• Fibrosis extendida e incremento en el número de vasos.	3
<b>INFILTRADO INFLAMATORIO</b>	• Células diseminadas o ausencia de infiltrado.	0
	• Grupos de células, pequeños agregados o focos de células polimorfonucleares.	1
	• Agregados frecuentes o formación de abscesos.	2
	• Infiltrados extensos o agregados grandes.	3
	• Sin tinción.	4

Tabla 4. Escala de Kreen de valoración histopatológica de la membrana sinovial (Krenn V, 2002).

### 3.11 Inmunohistoquímica.

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron según se ha descrito previamente (Palacios I, 1998). Brevemente, los cortes fueron desparafinados y rehidratados con concentraciones decrecientes de etanol. Para la detección de CD68, los cortes se incubaron con pepsina (0.5% peso/vol en HCl 0.1 N, pH 1.5) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo de la actividad de la

peroxidasa endógena, los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD68 humano (KP-1, DakoCytomation) a una concentración de 4 mg/ml durante toda la noche a 4° C en un ambiente húmedo. Después, los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el sistema EnVision+Ò (DakoCytomation) y posteriormente se trataron con el cromógeno 3-3'-diamino-benzidina (DAB; Sigma). Los cortes de tejido se contrastaron con hematoxilina de Mayer (Sigma). Se realizaron controles negativos en paralelo sustituyendo el anticuerpo primario por suero normal de ratón no inmune. Solo se incluyeron en el análisis los cortes de tejido sinovial en los cuales la capa íntima celular era identificable. Los cortes se evaluaron al azar por un investigador que desconocía los detalles clínicos de los pacientes. Para la evaluación se utilizó un análisis semicuantitativo usando una escala de 0-5 que permitía discriminar entre los bajos porcentajes de células positivas, como se ha descrito anteriormente (Dolhain RJ, 1998; Kane D, 2004) (0=0-1% de células positivas; 1=2-10%; 2=11-25%; 3=26-50%; 4=51-75%; 5=76-100%).

#### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados del densitometrado (unidades arbitrarias de densitometrado (UAD)) se expresan como n-veces sobre el control. Los resultados de los estudios de PCR a tiempo real (unidades arbitrarias (UA)) se expresan como n veces sobre el calibrador. La concentración de PGE<sub>2</sub> (pg/ml) y la de NO (µM) se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). Todos los análisis estadísticos se desarrollaron utilizando el programa SPSS 8.0 para Windows (SPSS Inc.). Los datos entre los diferentes grupos se compararon usando los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando fue necesario. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de la p fue inferior a 0.05.

## **IV. RESULTADOS**

## 1. EFICACIA DE UN INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA COX-2 EN PACIENTES CON ARTROSIS DE RODILLA.

Aunque la OA ha sido definida como una artropatía no inflamatoria, existen numerosos trabajos que indican que la inflamación sinovial juega un importante papel en la progresión de la OA (Pelletier JP, 2001a; Pelletier JP, 2001b). Varios estudios, experimentales y en pacientes, han demostrado que la síntesis de la PGE<sub>2</sub> y la COX-2 está incrementada en la membrana sinovial artrósica, sugiriendo que una inhibición selectiva de la actividad de la COX-2 podría mejorar la sintomatología de la OA (Iñiguez MA, 1998; Siegle I, 1998). Por lo tanto, el objetivo de esta primera parte de la tesis fue estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en la inflamación sinovial y en la expresión de genes proinflamatorios en la membrana sinovial de pacientes con artrosis de rodilla avanzada. Para ello comparamos el efecto de un inhibidor inespecífico de la COX, el aceclofenaco (ACF), y de uno selectivo de la COX-2, el celecoxib (CBX) y estudiamos la expresión y síntesis de los diferentes componentes de la ruta de las PG y del NO. También analizamos la expresión de citoquinas proinflamatorias y de las enzimas implicados en la degradación de la matriz extracelular.

### 1.1 Información de los pacientes y respuesta clínica.

Treinta pacientes con OA de rodilla, que se encontraban en lista de espera para la realización de una artroplastia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica del Hospital Virgen de la Cinta (Tortosa, Tarragona, España), se incluyeron en un estudio de tres meses de duración. Cinco de los treinta pacientes incluidos en el estudio fueron excluidos antes de la finalización del mismo. Uno de los pacientes del grupo del ACF fue eliminado porque sufrió complicaciones durante el tratamiento (dolor gástrico). Tres pacientes fueron excluidos porque no se pudieron obtener muestras de membrana sinovial durante la cirugía debido a problemas técnicos, y finalmente uno de los pacientes fue excluido porque no quiso someterse a la intervención.

Información Basal de los pacientes	CBX n=9	ACF n=7	CONTROL n=9
<b>Sexo</b>			
Masculino	22%	14%	22%
Femenino	78%	86%	78%
<b>Edad, años</b>	73±5	71±8	72±8
<b>WOMAC (VAS)</b>			
Después del lavado T1	2240±918	2807±644	1966±390
Anterior a Cirugía T2	1952±908*	2536±528*	2140±378*
Diferencia T2-T1	-289±308	-270±359	144±85

**Tabla 5. Información basal de los pacientes.** \*p<0.05 vs. los datos del mismo grupo de pacientes. En el momento T1.

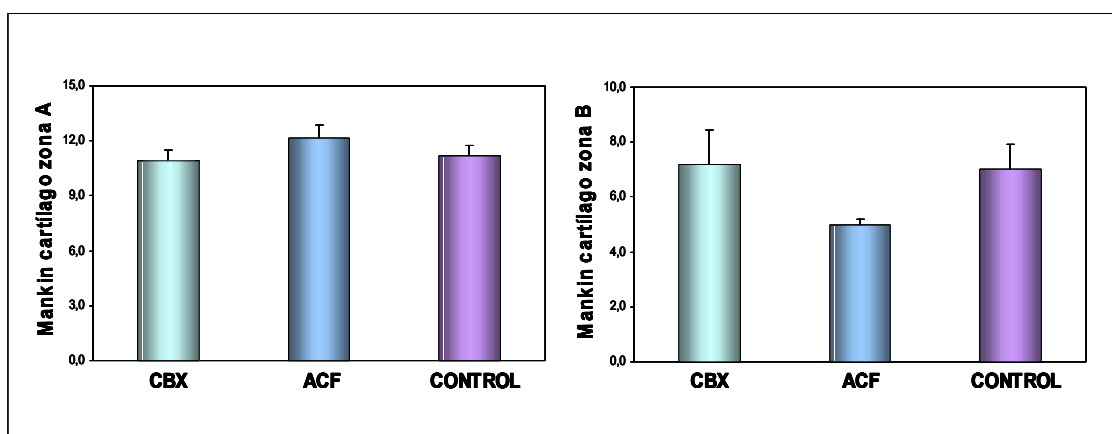


La tabla 5 muestra las características clínicas y demográficas de los pacientes. Los síntomas y la funcionalidad de los pacientes se evaluaron varias veces: T0, T1 y T2, como se ha descrito en el apartado de métodos. Tanto los pacientes tratados con el ACF ( $2536 \pm 528$  vs.  $2807 \pm 644$ ,  $p < 0.05$ ) como los tratados con el CBX ( $1952 \pm 908$  vs.  $2240 \pm 918$ ,  $p < 0.05$ ) presentaban una disminución significativa del dolor en T2 en comparación a T1 (Tabla 5). Sin embargo, los pacientes CONTROL ( $2140 \pm 378$  vs.  $1966 \pm 390$ ,  $p < 0.05$ ) mostraban un incremento significativo en el índice WOMAC en T2 comparado con T1, lo cual probablemente fuera debido a que no recibieron ningún tratamiento durante el estudio (Tabla 5).

## 1.2 Histopatología del cartílago articular.

Para la valoración histopatológica del cartílago articular se evaluaron muestras de la zona A (o zona de mayor lesión) y de la zona B (o zona de menor lesión) del cartílago articular, mediante la escala de Mankin en cortes teñidos con hematoxilina-eosina o con azul de toluidina. Las alteraciones histopatológicas que se encontraron se describen a continuación:

- Alteraciones de la estructura: en la zona A del cartílago articular de todos los pacientes incluidos en el estudio se describieron hendiduras o erosiones focales que alcanzaban la capa radial y que ocasionalmente llegaban hasta la zona de calcificación dejando expuesto el hueso subcondral. En cambio, en la zona B, se observaron irregularidades en la superficie con presencia de pannus, y en algunos casos se describieron hendiduras que llegaban hasta la zona de transición del cartílago.
- Alteraciones celulares: la zona A del cartílago articular presentaba, independientemente del grupo estudiado, una densidad celular baja y clones celulares frecuentes, que aparecían tanto en las capas superficiales como en las capas profundas del cartílago. En cuanto a la zona B, en algunos pacientes aparecieron clones celulares frecuentes e hiper celularidad difusa, mientras que en otros pacientes se describieron pocas alteraciones celulares.



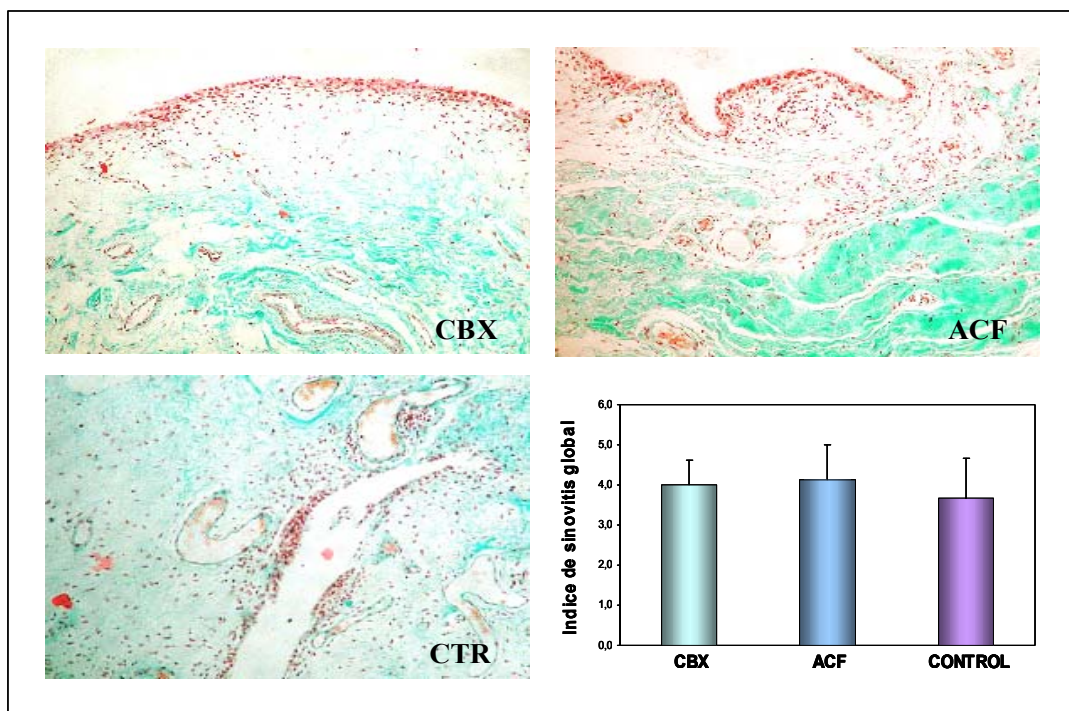
**Figura 6. Histopatología del cartílago articular en los pacientes de los grupos tratados con CBX, ACF y grupo CONTROL.** Las gráficas de barras muestran la valoración del daño del cartílago articular de acuerdo a la escala de Mankin como se describió en el apartado de Métodos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

- Alteraciones de la matriz: en la zona A del cartílago articular se produjo una disminución de la tinción de la matriz que fue desde moderada a severa dependiendo del paciente estudiado. En lo que se refiere a la zona B, también se produjo una disminución de la tinción de la matriz, pero en este caso, la disminución fue leve o moderada dependiendo del paciente estudiado.
- Alteraciones en la integridad de la limitante basófila: independientemente de la zona estudiada, los pacientes tratados con el CBX presentaron menos irregularidades en la limitante basófila por el cruce de vasos que los pacientes tratados con el ACF o los del grupo CONTROL.

A pesar de las alteraciones descritas anteriormente, no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos en ninguna de las subescalas estudiadas. En cuanto al Mankin total, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos incluidos en el estudio en ninguna de las zonas estudiadas (Figura 6).

### 1.3 Histopatología de la membrana sinovial.

Entre los hallazgos histopatológicos más importantes que se encontraron en la membrana sinovial de los pacientes incluidos en el estudio se incluye el incremento en la densidad de los vasos de la zona subintimal, la aparición de infiltrados leucocitarios e hiperplasia, desde puntual a difusa, en la capa íntima (Figura 7).

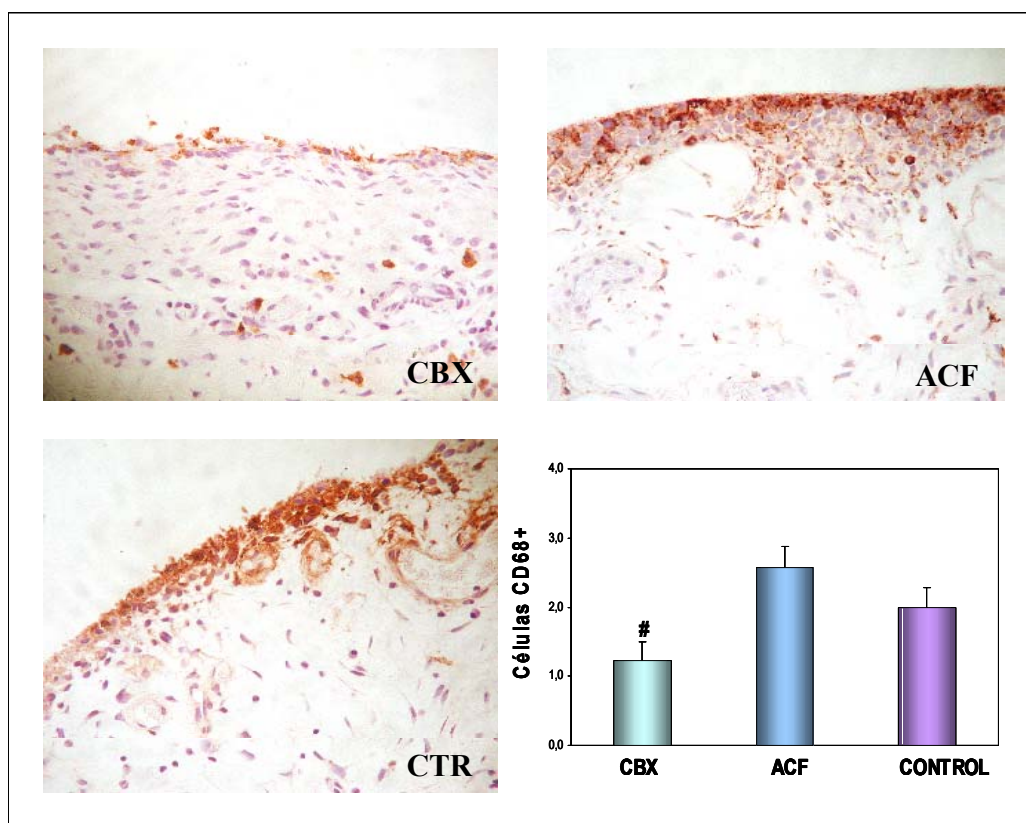


**Figura 7. Histopatología de la membrana sinovial en los pacientes de los grupos tratados con el CBX, el ACF y del grupo CONTROL.** Se muestran fotografías representativas de los 7-9 pacientes de cada grupo (Hematoxilina-eosina; aumento: 100x). La gráfica de barras muestra el índice de sinovitis global de acuerdo a la escala de Kreen como se describió en el apartado de Métodos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n= 7-9 pacientes por grupo.

Estos cambios se evaluaron en cada muestra de acuerdo a lo descrito en el apartado de métodos. Como se muestra en la figura 7, no se encontraron diferencias significativas en las lesiones de la membrana sinovial entre los tres grupos estudiados, así como tampoco en la sinovitis global o en cualquiera de las tres subescalas evaluadas. El índice de sinovitis global se obtuvo en cada uno de los grupos de acuerdo con las observaciones previas descritas por Kreen en tejidos artrósicos (Krenn V, 2002).

#### 1.4 Inmunohistoquímica de CD68.

La tinción de CD68 se localizó tanto en la capa íntima como en la subintima de la membrana sinovial (Figura 8). En los pacientes CONTROL se observó una tinción positiva para CD68 que presentaba una distribución desigual en la capa subintima, mientras que era muy abundante en la capa íntima (Figura 8). En los grupos tratados con los inhibidores de la COX el patrón de distribución de CD68 fue similar al de los tejidos sinoviales del grupo CONTROL (Figura 8), pero la cantidad de células positivas en la capa íntima y en el intersticio fue claramente menor en los pacientes tratados con el CBX en comparación a los tratados con el ACF ( $1,2 \pm 0,3$  vs.  $2,6 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Localización de las células CD68 positivas en la membrana sinovial de pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL.** Se muestran fotografías representativas de 7-9 pacientes de cada grupo (inmunoperoxidasa). La gráfica de barras muestra la evaluación semicuantitativa de acuerdo a lo descrito en el apartado de Métodos. \* $p < 0,05$  vs. ACF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

### 1.5 Concentración de la PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial.

Se midió la concentración de la PGE<sub>2</sub> en las muestras de LS previamente digeridas. La figura 9 muestra el resultado de la medida cuantitativa de la concentración de la PGE<sub>2</sub>. Los tratamientos con el CBX y el ACF fueron capaces de disminuir de forma significativa la concentración de la PGE<sub>2</sub> en el LS en comparación a los pacientes no tratados (CONTROL) (94,9±14,9 vs. 268,8±114,6 y 103,5±40,9 vs. 268,8±114,6 respectivamente,  $p < 0.05$ ). No existieron diferencias significativas en los niveles de la PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial entre los pacientes tratados con el CBX o el ACF.

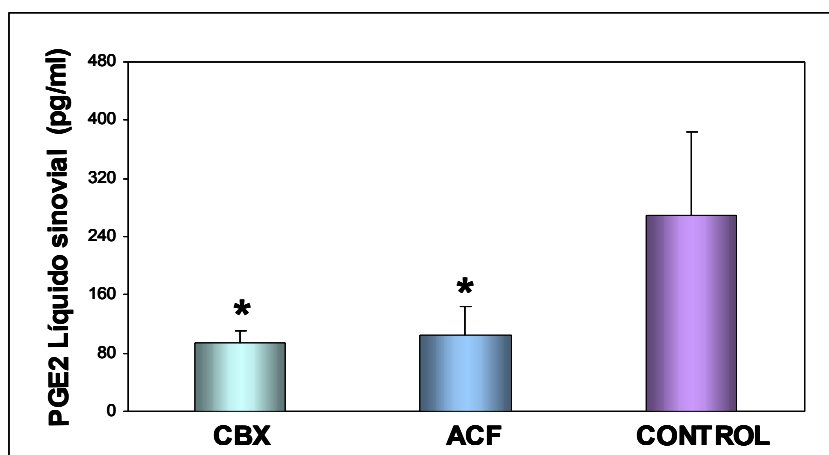


Figura 9. Concentración de la PGE<sub>2</sub> en el LS de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL en el momento de la cirugía. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

### 1.6 Concentración de NO en el líquido sinovial.

Quisimos comprobar si tampoco los tratamientos con el CBX o con el ACF eran capaces de modificar los niveles de NO presentes en el líquido sinovial de los pacientes. Para ello se midió la concentración de NO en las muestras de LS previamente digeridas. La figura 10 muestra el resultado de la medida cuantitativa de la concentración de NO. Ninguno de los tratamientos fue capaz de modificar de forma significativa los niveles de este mediador proinflamatorio en el líquido sinovial de los pacientes.

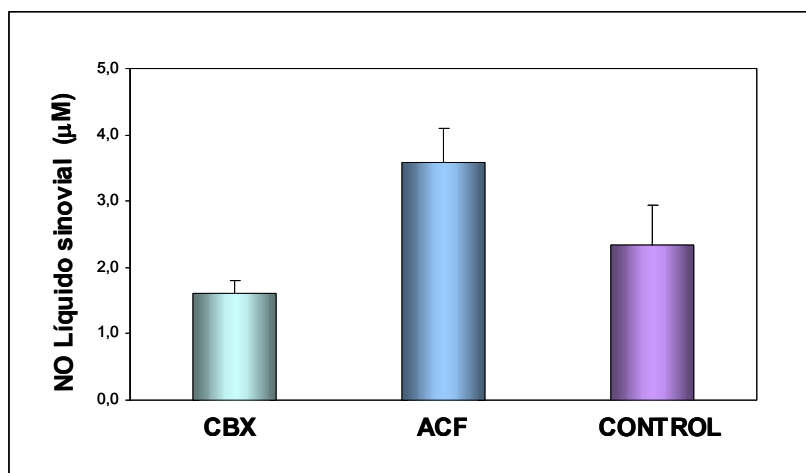
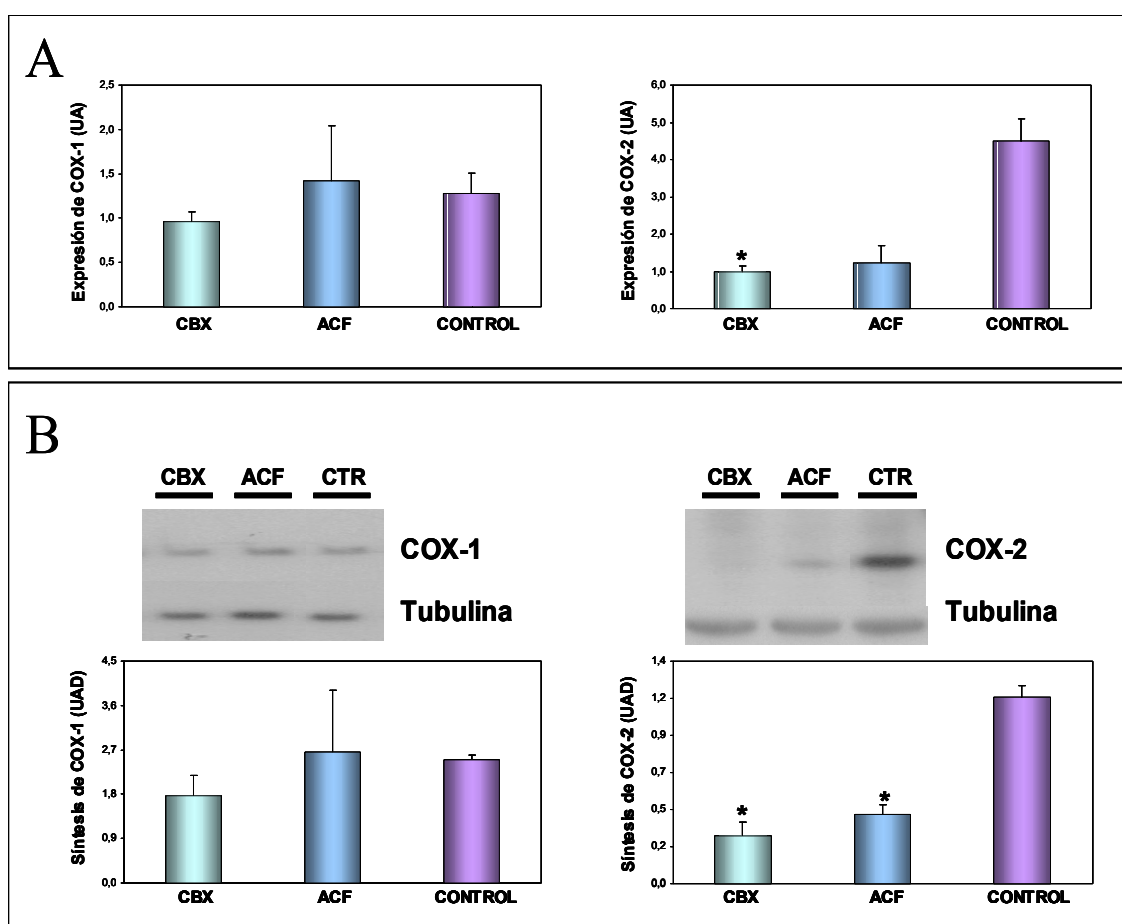


Figura 10. Concentración de NO en el LS de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL en el momento de la cirugía. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

### 1.7 Expresión y síntesis de la COX-1 y la COX-2.

Mediante estudios de PCR a tiempo real, se midió la expresión génica de la COX-1 y la COX-2 en el tejido sinovial de los pacientes artrósicos. Como se muestra en la figura 11, no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de la COX-1 entre los grupos CBX, ACF y CONTROL. Sin embargo la expresión génica de la COX-2 se encontraba disminuida significativamente en los pacientes tratados con el CBX en comparación al grupo CONTROL ( $1,0 \pm 0,1$  vs.  $4,5 \pm 0,6$ ,  $p < 0.05$ ). La expresión de la COX-2 en los pacientes tratados con el ACF presentaba una tendencia similar, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa en comparación al grupo CONTROL. Tampoco existían diferencias significativas en la expresión de la COX-2 entre el grupo CBX y el grupo ACF (Figura 11).

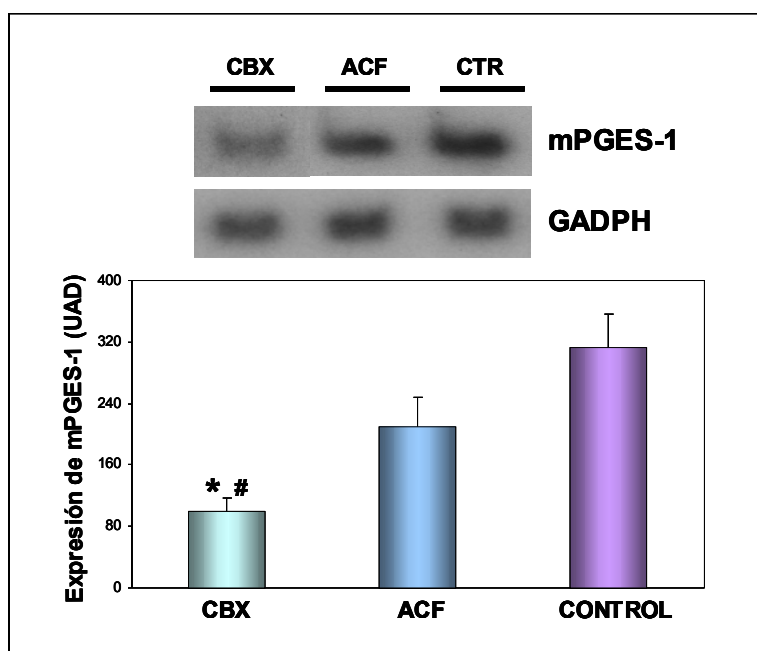


**Figura 11. Expresión y síntesis de la COX en la membrana sinovial de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL.** (A) Expresión génica de la COX-1 y de la COX-2, medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de la COX-1 y la COX-2 se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se eligió a uno de los pacientes CBX como calibrador=1). Todas las muestras se procesaron por triplicado. (B) Análisis de la presencia de la COX en la membrana sinovial de los pacientes. Panel superior: estudio de Western blot representativo correspondiente a las señales para la COX-1, la COX-2 y  $\alpha$ -tubulina. Panel inferior: Análisis densitométrico de la presencia de la COX-1 y la COX-2 expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

A continuación, mediante estudios de Western blot se estudió la síntesis de las proteínas COX-1 y COX-2. Como se muestra en la figura 11, se obtuvieron resultados similares a los encontrados para la expresión de ARN. La COX-1 se sintetizó de forma similar en los tres grupos de pacientes. Sin embargo, la proteína COX-2 se indujo en mayor cantidad en los pacientes CONTROL en comparación a los pacientes tratados. Tanto los pacientes tratados con el CBX como los tratados con el ACF tuvieron una expresión significativamente menor de la proteína COX-2 que los del grupo CONTROL (Figura 11). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la síntesis de la COX-2 entre los grupos CBX y ACF. Nuestros resultados también muestran una correlación significativa entre la presencia de la proteína COX-2 en la membrana sinovial y la concentración de la PGE<sub>2</sub> en el LS ( $p=0.46$ ;  $p<0.05$ ). El mismo estudio de correlación para la expresión génica de la COX-2 y la concentración de la PGE<sub>2</sub> no mostró resultados estadísticamente significativos.

### 1.8 Expresión de la mPGES-1.

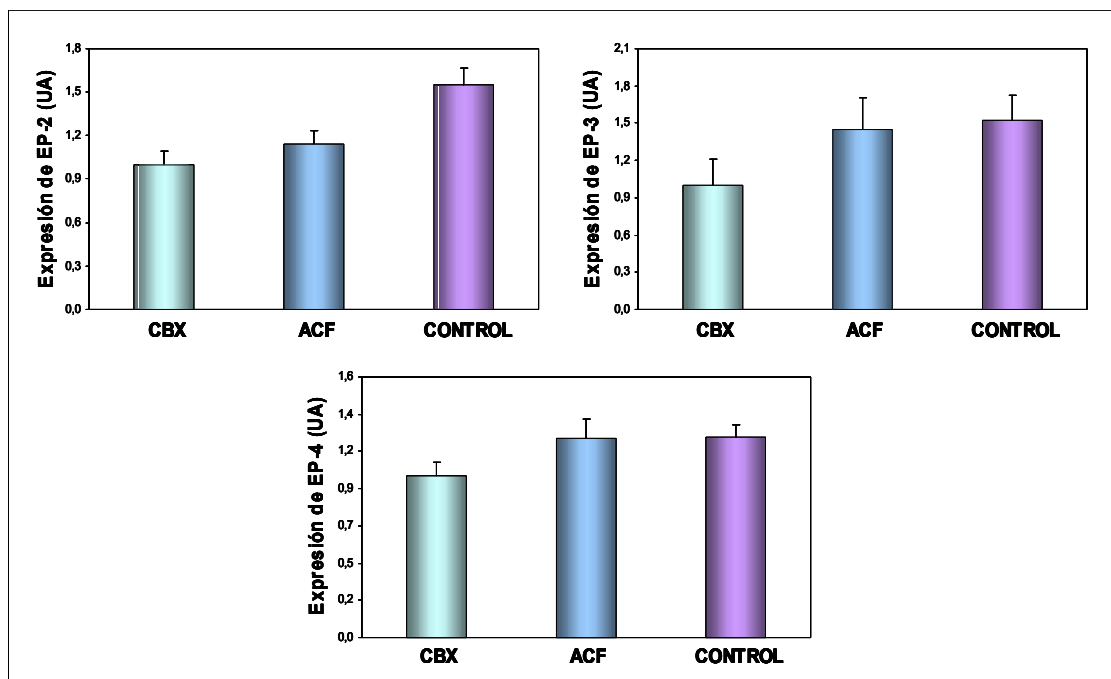
A continuación quisimos estudiar otra de las enzimas implicadas en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> y que también se encuentra aumentada en situaciones inflamatorias. Mediante estudios de RT-PCR medimos la expresión génica de la mPGES-1 en el tejido sinovial de los pacientes incluidos en el estudio. El tratamiento con el CBX disminuyó de forma significativa la expresión de la mPGES-1 en la membrana sinovial de los pacientes en comparación al grupo ACF ( $100\pm 17$  vs.  $210\pm 38$ ,  $p < 0.05$ ) y al CONTROL ( $100\pm 17$  vs.  $312\pm 44$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 12). En los pacientes tratados con el ACF la expresión de la enzima también disminuyó, aunque dicha disminución no fue significativa en comparación al grupo CONTROL (Figura 12).



**Figura 12: Expresión génica de la mPGES-1.** (A) Estudio de RT-PCR representativo correspondiente a las amplificaciones de la mPGES-1 y la GAPDH en las membranas sinoviales de los pacientes. (B) Análisis densitométrico de los cambios en la expresión de la mPGES-1 con respecto a la expresión de la GAPDH. \* $p<0.05$  vs. CONTROL; #  $p<0.05$  vs ACF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n= 7-9 pacientes por grupo.

### 1.9 Expresión génica de los receptores de la PGE<sub>2</sub>.

Quisimos estudiar si alguno de los inhibidores de la COX utilizados en el estudio era capaz de modificar la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> (EP2, EP3 y EP4) en la membrana sinovial de pacientes artrósicos.

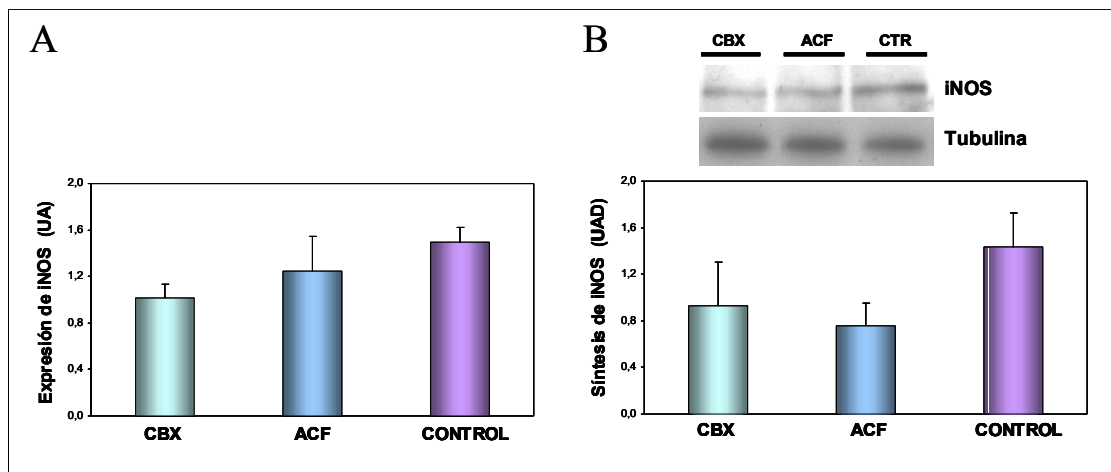


**Figura 13. Expresión génica de EP2, EP3 y EP4, medida por PCR cuantitativa a tiempo real.** Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de EP2, EP3 y EP4 se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se eligió a uno de los pacientes CBX como calibrador=1). Todas las muestras se procesaron por triplicado. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n= 7-9 pacientes por grupo.

Para ello realizamos estudios de PCR cuantitativa y observamos que ninguno de los tratamientos era capaz de modificar la expresión génica de ninguno de estos receptores, no existiendo diferencias significativas entre los tres grupos incluidos en el estudio (Figura 13).

### 1.10 Expresión génica y síntesis de la iNOS.

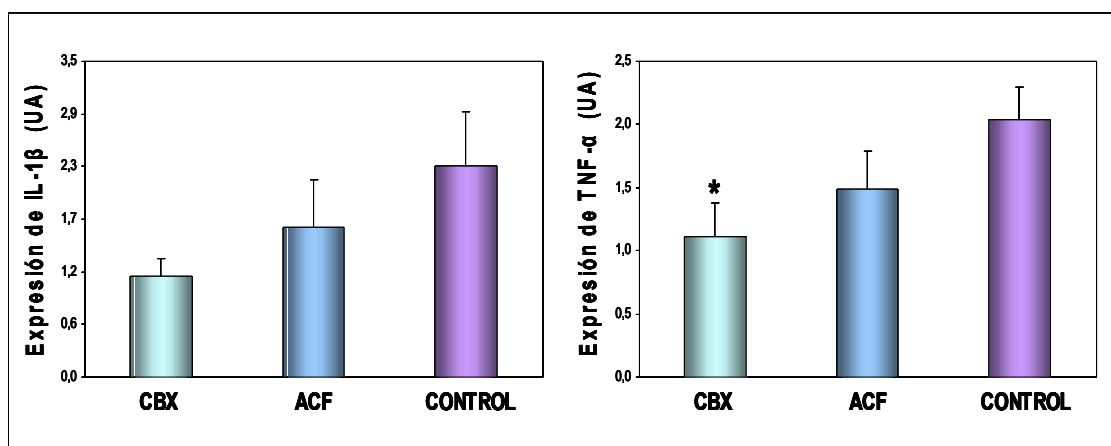
Quisimos comprobar el efecto de los dos inhibidores de la ciclooxigenasa utilizados en este estudio sobre la expresión génica y la síntesis de otra enzima que juega un papel fundamental en situaciones inflamatorias, la iNOS. Mediante estudios de PCR a tiempo real, se midió la expresión génica de la iNOS en el tejido sinovial de los pacientes artrósicos. Como se muestra en la figura 14, no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de la iNOS entre los grupos CBX, ACF y CONTROL. A continuación, mediante estudios de Western blot estudiamos la síntesis de la proteína iNOS. Como se puede observar en la figura 14, se obtuvieron similares resultados a los encontrados para la expresión de ARN, observándose que la iNOS se sintetizó de forma similar en los tres grupos de pacientes, no existiendo diferencias significativas entre los tres grupos estudiados.



**Figura 14. Expresión y síntesis de la iNOS en la membrana sinovial de los pacientes. (A): Expresión génica de la iNOS**, medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de la iNOS se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se eligió a uno de los pacientes CBX como calibrador=1). Todas las muestras se procesaron por triplicado. **(B): Análisis de la presencia de iNOS en la membrana sinovial de los pacientes.** Panel superior: estudio de Western blot representativo correspondiente a las señales para la iNOS y  $\alpha$ -tubulina. Panel inferior: Análisis densitométrico de la presencia de la iNOS expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n= 7-9 pacientes por grupo.

### 1.11 Expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$

Para estudiar si el tratamiento con los AINE podría modificar la expresión y síntesis de las citoquinas en el tejido sinovial en la OA, estudiamos la expresión génica y la síntesis proteica de dos citoquinas proinflamatorias asociadas al desarrollo de la enfermedad.



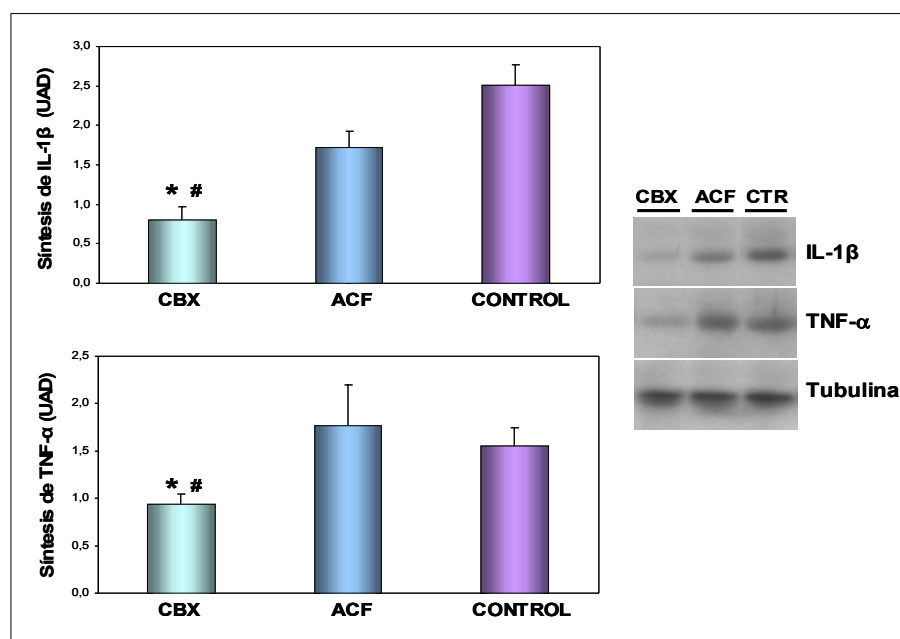
**Figura 15. Expresión génica de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en la membrana sinovial de los pacientes**, medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se eligió a uno de los pacientes CBX como calibrador=1). \*p<0.05 vs. CONTROL. Todas las muestras se procesaron por triplicado. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n= 7-9 pacientes por grupo.

Mediante estudios de PCR cuantitativa observamos que los tratamientos no modificaban de forma significativa la expresión génica de IL-1 $\beta$  en la membrana sinovial de los pacientes, aunque



existía una clara tendencia en los pacientes tratados con CBX hacia la disminución de la expresión de la IL-1 $\beta$  (Figura 15). En los pacientes tratados con el CBX se inhibió de forma significativa la expresión del TNF- $\alpha$  en comparación a los pacientes CONTROL, mientras que no se observó ningún efecto en el grupo ACF (Figura 15).

Para saber si la expresión génica se correlacionaba con la presencia de la proteína, se realizó un estudio de Western blot para detectar la presencia de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en los extractos de membrana sinovial.



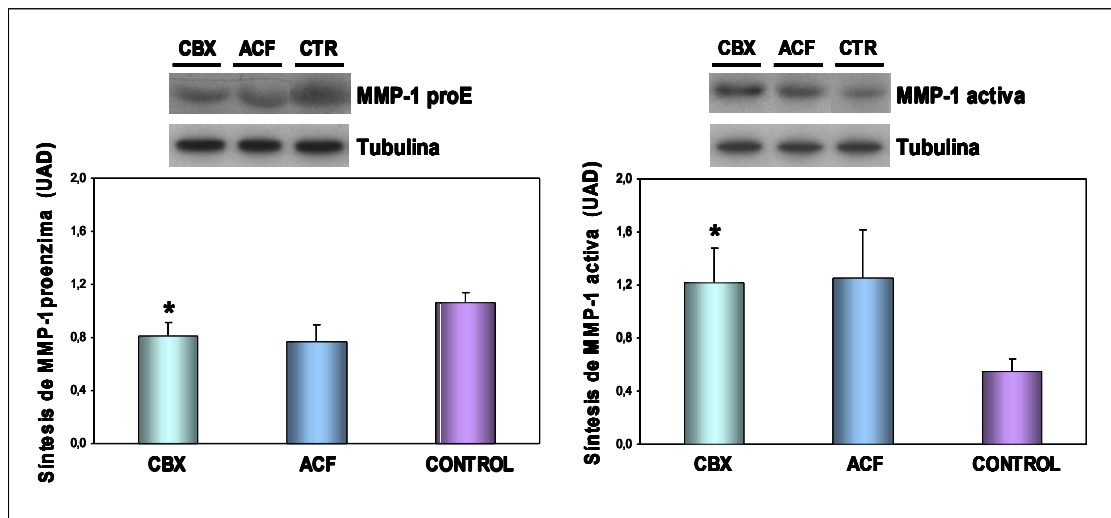
**Figura 16. Análisis de la presencia de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en la membrana sinovial de los pacientes.** Panel derecho: Se muestra un experimento de Western blot representativo correspondiente a las señales para la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y  $\alpha$ -tubulina. Panel izquierdo: Análisis densitométrico de los niveles de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL; #  $p < 0.05$  vs ACF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

Nuestros resultados demostraron que ambas proteínas estaban disminuidas significativamente en el grupo CBX en comparación con el grupo CONTROL, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes ACF y los CONTROL (Figura 16). Además, se encontraron diferencias significativas en la síntesis de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  entre los grupos CBX y ACF (Figura 16).

### 1.12 Síntesis de la MMP-1 y la MMP-3.

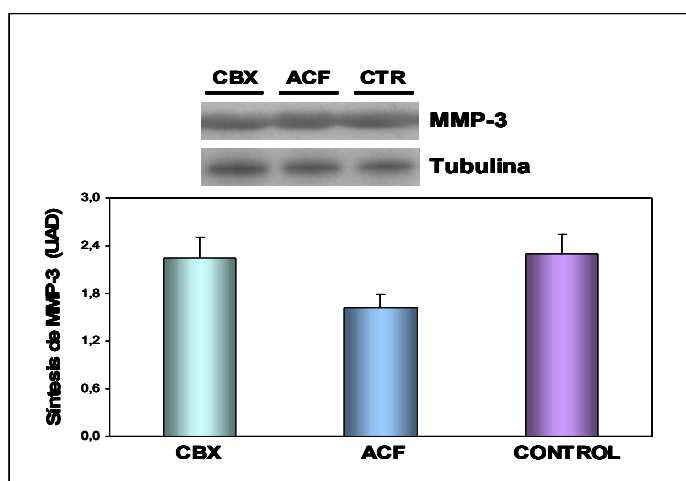
Para estudiar si el tratamiento con el CBX o el ACF era capaz de controlar la síntesis de la MMP-1 o de la MMP-3, mediante Western Blot medimos los niveles de estas enzimas en la membrana sinovial de pacientes artrósicos. Como se puede observar en la figura 17 el tratamiento con el CBX disminuyó de forma significativa los niveles de la proenzima de la MMP-1 en comparación al grupo CONTROL ( $0,8 \pm 0,1$  vs.  $1,1 \pm 0,1$ ,  $p < 0.05$ ). En cambio, el CBX incrementó de forma significativa los niveles de la enzima activa en comparación al grupo CONTROL ( $1,2 \pm 0,3$  vs.  $0,6 \pm 0,1$ ,  $p < 0.05$ ). El ACF presentaba una tendencia similar, de forma que era capaz de disminuir los niveles de la

proenzima de la MMP-1 y a la vez aumentar los niveles de la forma activa, sin embargo, en ninguno de los dos casos las diferencias fueron significativas en comparación al grupo CONTROL (Figura 17).



**Figura 17. Análisis de la presencia de la MMP-1 en la membrana sinovial de los pacientes.** (A) Panel superior: Western blot representativo correspondiente a las señales para la forma proenzimática de la MMP-1 y  $\alpha$ -tubulina. Panel inferior: Análisis densitométrico de los niveles de la enzima expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. (B) Panel superior: Western blot representativo correspondiente a las señales para la forma activa de la MMP-1 y  $\alpha$ -tubulina. Panel inferior: Análisis densitométrico de los niveles de la enzima expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

En cuanto a la expresión de la MMP-3, mediante Western Blot se midieron los niveles de esta enzima en la membrana sinovial de los pacientes del grupo CBX, ACF y CONTROL. Como se puede observar en la figura 18, ninguno de los tratamientos fue capaz de modificar los niveles de la enzima en comparación al grupo CONTROL. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento.



**Figura 18. Análisis de la presencia de la MMP-3 en la membrana sinovial de los pacientes.** Panel superior: Western blot representativo correspondiente a las señales para la MMP-3 y  $\alpha$ -tubulina. Panel inferior: Análisis densitométrico de los niveles de la MMP-3 expresado en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM,  $n = 7-9$  pacientes por grupo.

## **2. EFECTO DE LA INTERLEUQUINA (IL)-1 $\beta$ Y DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)- $\alpha$ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EN CONDROCITOS SANOS.**

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que presentan funciones fisiológicas en la homeostasis normal del los tejido pero que cuando son producidas en cantidades excesivas conducen a situaciones patológicas. La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , son dos de los principales mediadores que participan en la destrucción del cartílago en la OA. Estas citoquinas son capaces de inducir su propia producción al tiempo que inducen en sinoviocitos y condrocitos la estimulación de otros mediadores como la IL-8, la IL-6 y el factor de inhibición leucocitaria (LIF) (López-Armada MJ, 2004; Mor A, 2005). En este apartado quisimos evaluar el efecto de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  sobre la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> y sobre la principal enzima implicada en la síntesis del mediador, la COX-2.

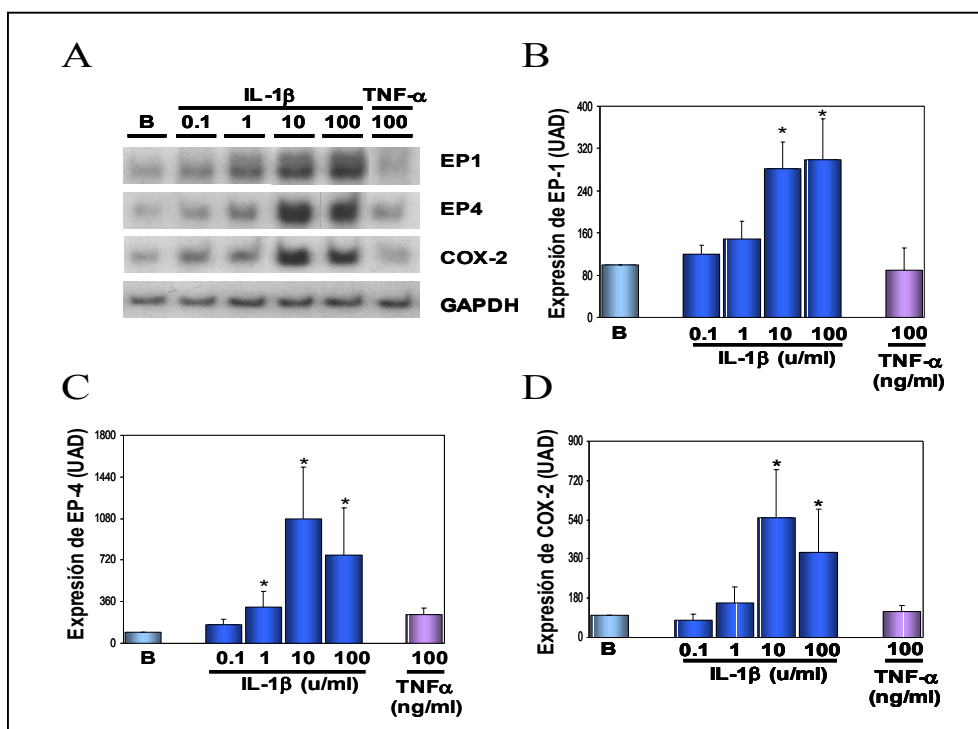
### **2.1 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.**

Para comprobar que ninguno de los compuestos utilizados en los estudios *in vitro* alteraba la viabilidad celular se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular mediante tinciones con azul de trypan en todas las condiciones experimentales utilizadas en esta parte de la tesis. En ningún caso se observó que alguno de los compuestos utilizados alterara la supervivencia celular, siendo la viabilidad celular superior al 90% en cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas. En todos los experimentos realizados en esta parte, la células fueron preincubadas con los diferentes fármacos antes de estimularlas con la IL-1 $\beta$ . Además, ninguno de los fármacos usados produjo un efecto directo sobre la expresión de las células en estado basal a las concentraciones y periodos de incubación utilizados en el estudio.

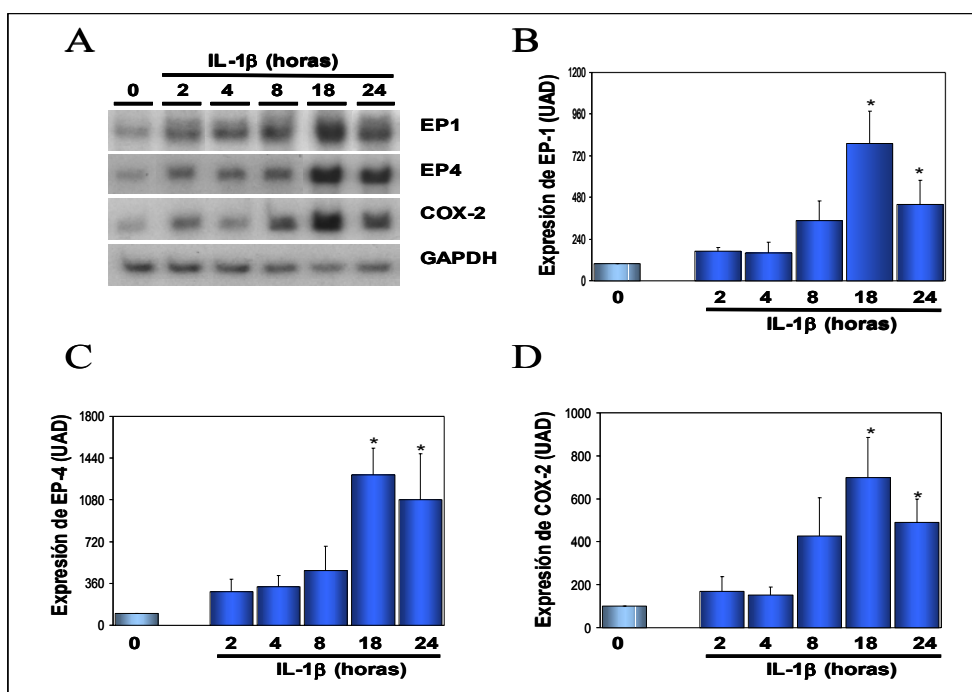
### **2.2 Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la expresión de los receptores EP y la COX-2 en condrocitos de conejo y humanos.**

Mediante técnicas de RT-PCR se estudió la expresión del ARNm de EP-1, EP-4 y COX-2 en condrocitos de conejo. No fue posible estudiar la expresión génica de los receptores EP-2 y EP-3 debido a que no estaba publicada la secuencia de estos receptores en conejo. En los experimentos realizados con diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$  (0.1 a 100 u/ml) demostramos que la presencia de esta citoquina en el medio incrementó de forma significativa la expresión de los receptores EP-1 y EP-4 y de la COX-2 en comparación a células no estimuladas (figura 19). Elegimos la dosis de 10 u/ml para llevar a cabo el resto de los experimentos.

Mediante técnicas de RT-PCR también estudiamos el efecto tiempo-dependiente de la estimulación de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de EP-1, EP-4 y COX-2 en condrocitos de conejo. Estimulamos las células con IL-1 $\beta$  (10 u/ml), durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18, 24 horas). Como se muestra en la figura 20, la presencia de la IL-1 $\beta$  incrementó de forma significativa la expresión de los tres genes estudiados en condrocitos de conejo sanos. Observamos que el incremento en la expresión tanto de la COX-2 como de los receptores EP-1 y EP-4 producido por la



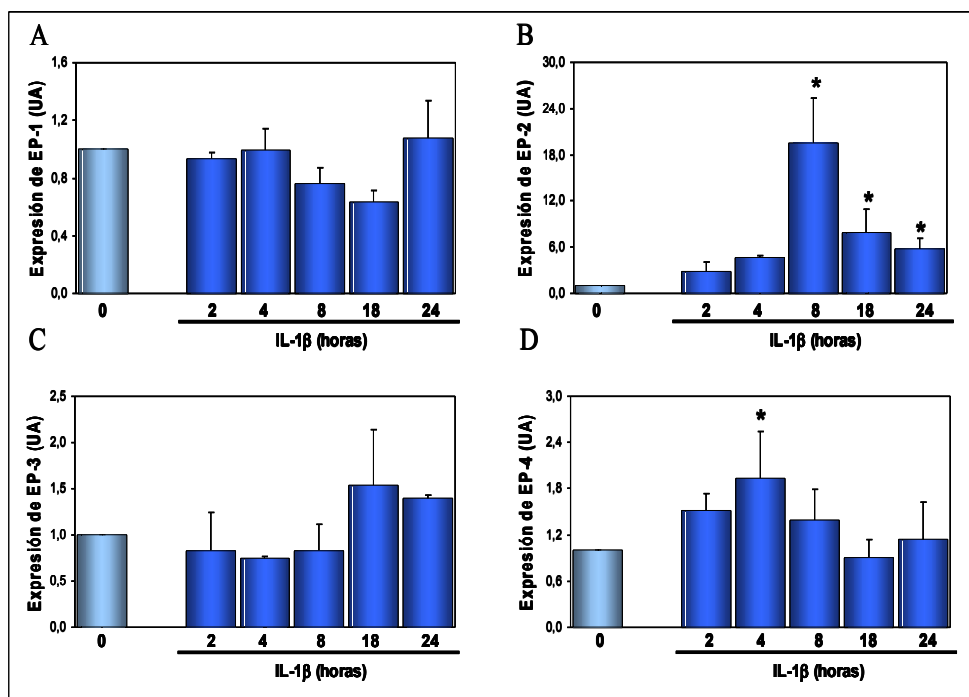
**Figura 19. Efecto de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en la expresión génica de EP-1, EP-4 y COX-2 en condrocitos de conejo.** Las células se estimularon con diferentes dosis de IL-1 $\beta$  (0.1 a 100 u/ml) o TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) durante 24 horas. (A) Autorradiografía representativa de cinco experimentos diferentes con resultados similares. (B), (C), (D) Análisis densitométrico correspondiente a los cambios en los niveles de ARNm de EP-1, EP-4 y COX-2, respectivamente, corregidos por los niveles de expresión de la GAPDH en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) como Media $\pm$ E.E.M. \*p<0.05 vs B (expresión basal). (n= 4-5).



**Figura 20. Efecto tiempo dependiente de IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de EP-1, EP-4 y COX-2 en condrocitos de conejo.** Las células se estimularon durante diferentes períodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con IL-1 $\beta$  (10 u/ml). (A) Autorradiografía representativa de tres experimentos diferentes con resultados similares. (B), (C), (D) Análisis densitométrico correspondiente a los cambios en los niveles de ARNm de EP-1, EP-4 y COX-2, respectivamente, corregidos por los niveles de expresión de la GAPDH en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) como Media $\pm$ E.E.M. \*p<0.05 vs 0 horas de incubación. (n= 3).

IL-1 $\beta$  fue dependiente del tiempo de incubación, alcanzándose un efecto estadísticamente significativo entre las 18 y las 24 horas de incubación (figura 20).

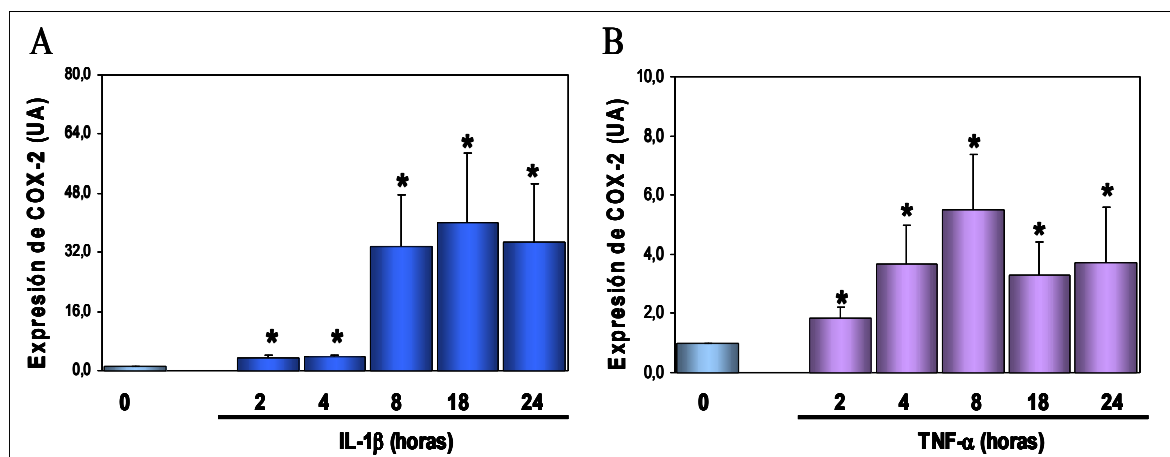
A continuación estudiamos, mediante técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real, si la IL-1 $\beta$  era capaz de modificar la expresión de los receptores EP-1, EP-2, EP-3 y EP-4 y de la COX-2 en condrocitos humanos de pacientes con OA de rodilla. Para ello estimulamos los condrocitos con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) y analizamos la expresión de los genes de interés.



**Figura 21. Efecto tiempo dependiente de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de EP-1, EP-2, EP-3 y EP-4 en condrocitos humanos.** Las células se estimularon durante diferentes periodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con IL-1 $\beta$  (10 u/ml). (A-D) Expresión génica de los diferentes receptores medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de los receptores se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada punto para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se utilizó el punto de 0 horas de incubación como calibrador=1). Los resultados se expresan como Media $\pm$ E.E.M. \* $p$ <0.05 vs 0 horas de incubación. (n= 3).

Como se muestra en la figura 21, la IL-1 $\beta$  no incrementó la expresión ni de EP-1 ni de EP-3 en comparación a células no estimuladas al mismo tiempo de incubación. En cuanto a la expresión de los otros dos receptores, la presencia de la IL-1 $\beta$  incrementó de forma significativa en condrocitos humanos la expresión tanto de EP-2 como de EP-4, en comparación a células no estimuladas, alcanzando un máximo de expresión entre las 8 y las 24 horas de incubación, en el caso de EP-2, y a las 4 horas en el caso de EP-4 (figura 21).

Finalmente estudiamos la expresión de la COX-2 en condrocitos humanos estimulados con IL-1 $\beta$  a diferentes tiempos de incubación, y observamos que, al igual que en condrocitos de conejo, la citoquina producía un incremento tiempo dependiente en la expresión de la COX-2 que fue significativo a todos los tiempos estudiados alcanzando un pico de expresión entre las 8 y las 24 horas en comparación a células no estimuladas en el mismo tiempo de incubación (figura 22A).



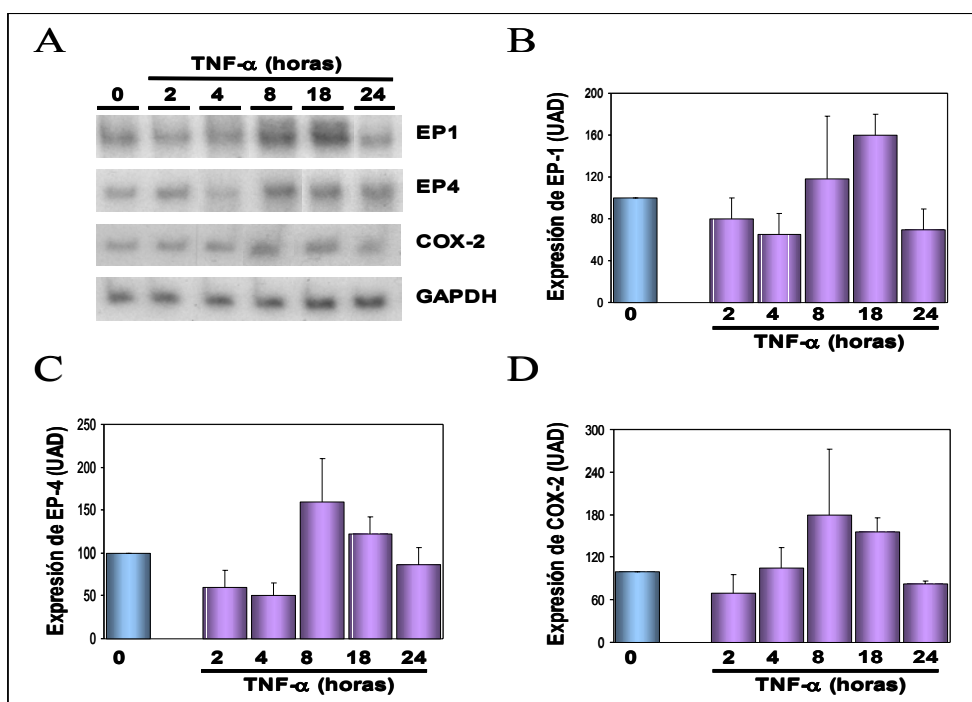
**Figura 22. Efecto tiempo dependiente de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  sobre la expresión génica de la COX-2 en condrocitos humanos.** Las células se estimularon durante diferentes períodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) (A) o TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) (B). (A-B) Expresión génica de la COX-2 medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de COX-2 se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada punto para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se utilizó el punto de 0 horas de incubación como calibrador=1). Los resultados se expresan como Media $\pm$ E.E.M. \* $p$ <0.05 vs 0 horas de incubación. (n= 3).

### 2.3 Efecto del TNF- $\alpha$ sobre la expresión de los receptores EP y la COX-2 en condrocitos de conejo y humanos.

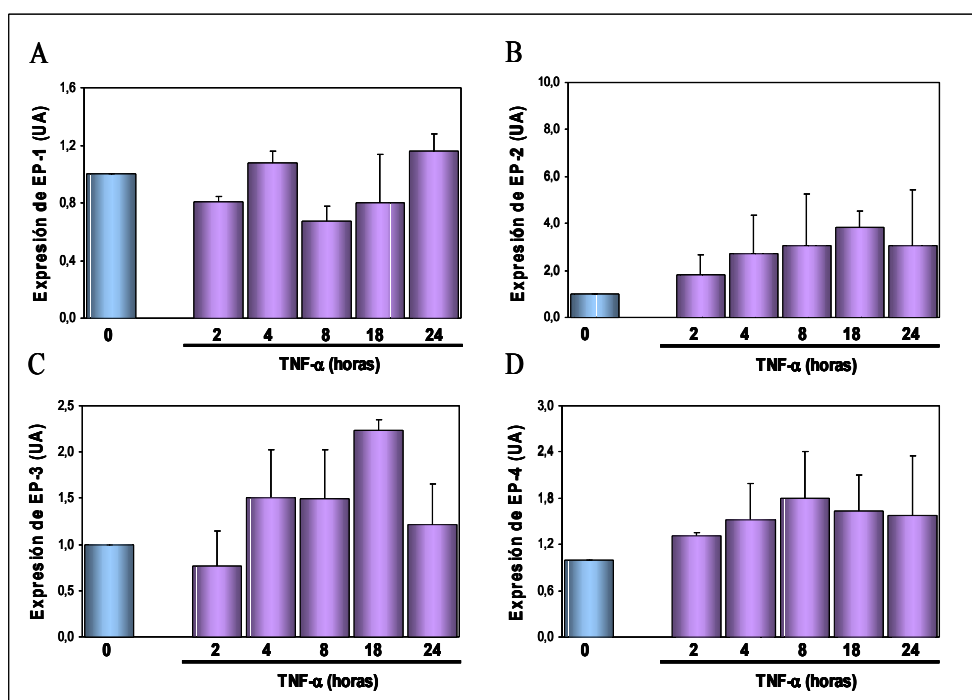
A continuación realizamos experimentos similares a los descritos en el apartado anterior para determinar si otra citoquina muy implicada en procesos inflamatorios, el TNF- $\alpha$ , era capaz de modificar la expresión de los receptores EP o de la COX-2. Se utilizaron diferentes dosis de esta citoquina (0.1 a 100 ng/ml). A diferencia de los resultados obtenidos con la IL-1 $\beta$ , no observamos ningún efecto significativo en la modificación de la expresión de estos genes, incluso a la dosis de 100 ng/ml (figura 19, solo se muestran los datos correspondientes a la dosis de 100 ng/ml).

Además estimulamos los condrocitos de conejo, con la máxima dosis de TNF- $\alpha$  utilizada (100 ng/ml), durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18, 24 horas) y analizamos la expresión de EP-1, EP-4 y COX-2. En ningún caso el TNF- $\alpha$  modificó la expresión de estos genes de forma significativa, en comparación a células no estimuladas al mismo tiempo de incubación (figura 23).

A continuación quisimos estudiar el efecto del TNF- $\alpha$  en condrocitos humanos procedentes de pacientes con artrosis de rodilla. Para ello estimulamos las células con TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) y mediante técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real analizamos la expresión de los receptores EP y de la COX-2. Como se puede observar en la figura 24, la incubación de los condrocitos humanos con el TNF- $\alpha$  no incrementó de forma significativa la expresión de los receptores EP a ninguno de los tiempos estudiados en comparación con células no estimuladas en el mismo tiempo de incubación.



**Figura 23. Efecto tiempo dependiente del TNF-α sobre la expresión génica de EP-1, EP-4 y COX-2 en condrocitos de conejo.** Las células se estimularon durante diferentes períodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con TNF-α (100 ng/ml). (A) Autoradiografía representativa de tres experimentos diferentes con resultados similares. (B), (C), (D) Análisis densitométrico correspondiente a los cambios en los niveles de mRNA de EP-1, EP-4 y COX-2, respectivamente, corregidos por los niveles de expresión de la GAPDH en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) como Media±E.E.M. (n= 3).



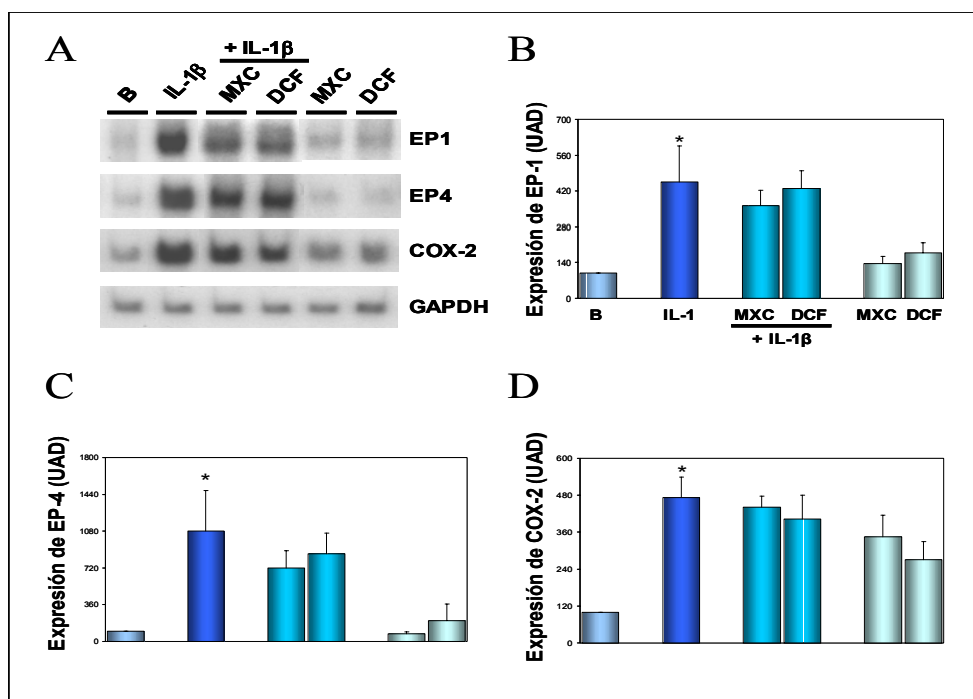
**Figura 24. Efecto tiempo dependiente de TNF-α sobre la expresión génica de EP-1, EP-2, EP-3 y EP-4 en condrocitos humanos.** Las células se estimularon durante diferentes períodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con TNF-α (100 ng/ml). (A-D) Expresión génica de los diferentes receptores medida por PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó el método comparativo de Ct para la cuantificación relativa. La expresión del ARNm de los receptores se normalizó en relación a la expresión de 18S en cada pocillo, y el valor de cada punto para la expresión génica de cada gen se normalizó entonces en relación al valor del calibrador (se utilizó el punto de 0 horas de incubación como calibrador=1) Los resultados se expresan como Media±E.E.M. \*p<0.05 vs 0 horas de incubación. (n= 3).

Finalmente analizamos la expresión de la COX-2 y observamos que el TNF- $\alpha$  también era capaz de incrementar de forma tiempo dependiente la expresión de la ciclooxigenasa en condrocitos humanos. Este incremento fue significativo a todos los tiempos estudiados, alcanzando los niveles máximos de expresión a las 8 horas en comparación a células no estimuladas en el mismo tiempo de incubación (figura 22B).

#### 2.4 Efecto de los AINE sobre la expresión génica de los receptores EP1 y EP4 y la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$ .

Para evaluar el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena en la expresión de los receptores EP-1 o EP-4 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos de conejo, utilizamos dos inhibidores COX-1/COX-2 no selectivos, como el DCF y el MXC, con diferente perfil inhibitorio sobre la COX-2 (Bertolini A, 2001).

Para ello, los condrocitos se preincubaron durante 1 hora con MXC 10<sup>-6</sup> M o DCF 10<sup>-6</sup> M. A continuación estimulamos las células con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. La figura 25 muestra que la incubación de las células con MXC 10<sup>-6</sup> M o DCF 10<sup>-6</sup> M sólo no modificó la expresión génica de los receptores EP-1 y EP-4 o de la COX-2 en condrocitos de conejo. Más aún, las células preincubadas con los AINE y estimuladas con la IL-1 $\beta$  mostraron el mismo incremento en la expresión génica de los receptores EP-1 y EP-4 o de la COX-2 que aquellas expuestas únicamente a la IL-1 $\beta$ .



**Figura 25. Efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre la expresión génica de los receptores EP-1 y EP-4 y la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$ .** Las células se preincubaron durante 1 hora con MXC 10<sup>-6</sup> M o DCF 10<sup>-6</sup> M y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Autoradiografía representativa de cinco experimentos diferentes con resultados similares. (B), (C), (D) Análisis densitométrico correspondiente a los cambios en los niveles de ARNm de EP-1, EP-4 y COX-2, respectivamente, corregidos por los niveles de expresión de la GAPDH en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) como Media $\pm$ E.E.M. \*p<0.05 vs B (expresión basal). (n= 4-5).



### **3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> Y OTROS FÁRMACOS ANTI-OA EN EL METABOLISMO DE CONDROCITOS Y SINOVIOCITOS ARTRÓDICOS EN CULTIVO.**

A continuación nos propusimos estudiar cuál era el efecto de la presencia de inhibidores de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> y de otros fármacos anti-OA sobre el metabolismo de condrocitos y sinoviocitos artróticos en cultivo. Empleamos para ello varios antiinflamatorios como MXC, DCF, IND y CBX que se diferencian con diferente perfil inhibitorio sobre la COX-2. Estudios anteriores han establecido que el MXC y la IND son inhibidores duales de la ciclooxigenasa, de forma que inhiben tanto a la COX-1 como a la COX-2. El MXC es un inhibidor preferencial de la COX-2, de forma que mientras inhibe el 80% de la actividad de la COX-2, también es capaz de inhibir un 20% de la actividad de COX-1 (Bertolini A, 2001). Finalmente, el CBX es un inhibidor selectivo de la COX-2 no inhibiendo a la COX-1 (Clemett D, 2000).

Además evaluamos simultáneamente el efecto de algunos SYSADOA como el SG, la DC, el CS, de otros azúcares biológicos como el HG, la AcG y la NAC y de glucocorticoides como la MP sobre la activación de diferentes mediadores proinflamatorios y estructurales inducidos por citoquinas proinflamatorias en condrocitos y sinoviocitos humanos procedentes de pacientes con OA.

#### **3.1 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.**

Al igual que en el apartado anterior para comprobar que ninguno de los compuestos utilizados en los estudios *in vitro* realizados en esta parte de la tesis alteraba la viabilidad celular se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular mediante tinciones con azul de trypan en todas las condiciones experimentales utilizadas. En ningún caso se observó que alguno de los compuestos utilizados alterara la supervivencia celular, siendo la viabilidad celular superior al 90% en cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas. En todos los experimentos realizados en esta parte, la células fueron preincubadas con los diferentes fármacos antes de estimularlas con la IL-1 $\beta$ . Además, ninguno de los fármacos usados produjo un efecto directo sobre la expresión de las células en estado basal a las concentraciones y periodos de incubación utilizados en el estudio.

#### **3.2 Efecto de los fármacos sobre la producción de la PGE<sub>2</sub>.**

Quisimos comparar el efecto de diferentes AINE sobre la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> con el de otros fármacos anti-OA comúnmente utilizados en el tratamiento de la OA. Con este motivo medimos la liberación de la PGE<sub>2</sub> al sobrenadante tras estimular las células con la IL-1 $\beta$  durante 24 horas. La estimulación con IL-1 $\beta$  provocó, tanto en condrocitos como en sinoviocitos un incremento en la concentración de PGE<sub>2</sub> medida en el sobrenadante celular (Figura 26 y 27).

En lo que se refiere a condrocitos, los tres compuestos de glucosamina (AcG, SG y HG) fueron capaces de disminuir el incremento en la liberación de la PGE<sub>2</sub> inducido por la IL-1 $\beta$  (inhibición del 38, 60 y 56 %; p= 0.040, 0.006 y 0.009 respectivamente). En cambio, la DC, el C-6S y la NAC no modificaron la liberación de la PGE<sub>2</sub> inducida por la citoquina (Figura 26). La presencia de la MP y de los AINE disminuyó de forma significativa la liberación basal de la PGE<sub>2</sub> (p<0.01 en todos los casos,

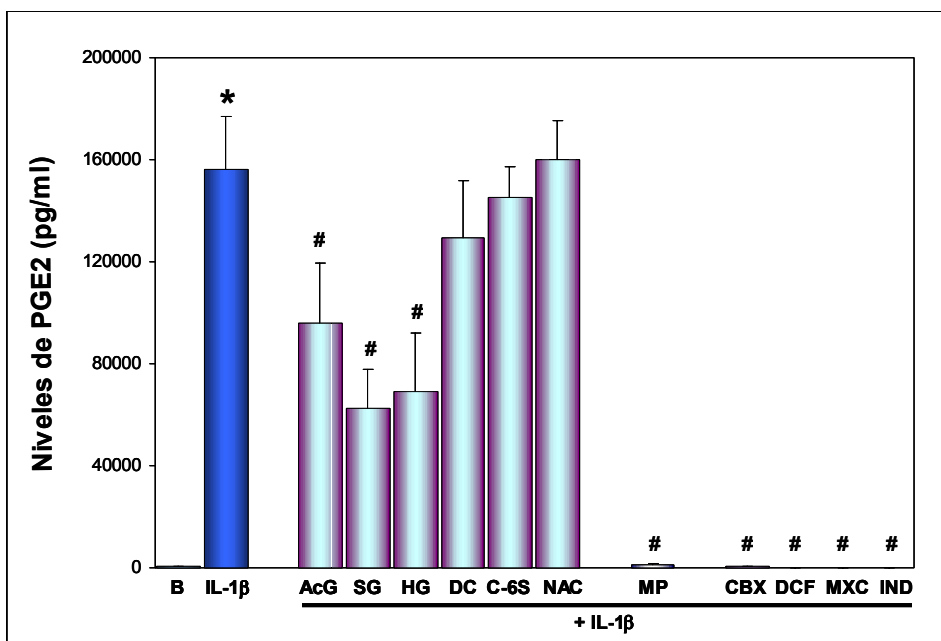


Figura 26. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1β en condrocitos humanos. Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1β (10 u/ml) durante 24 horas. La concentración de PGE<sub>2</sub> se muestra como Media±E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1β (n= 6-11).

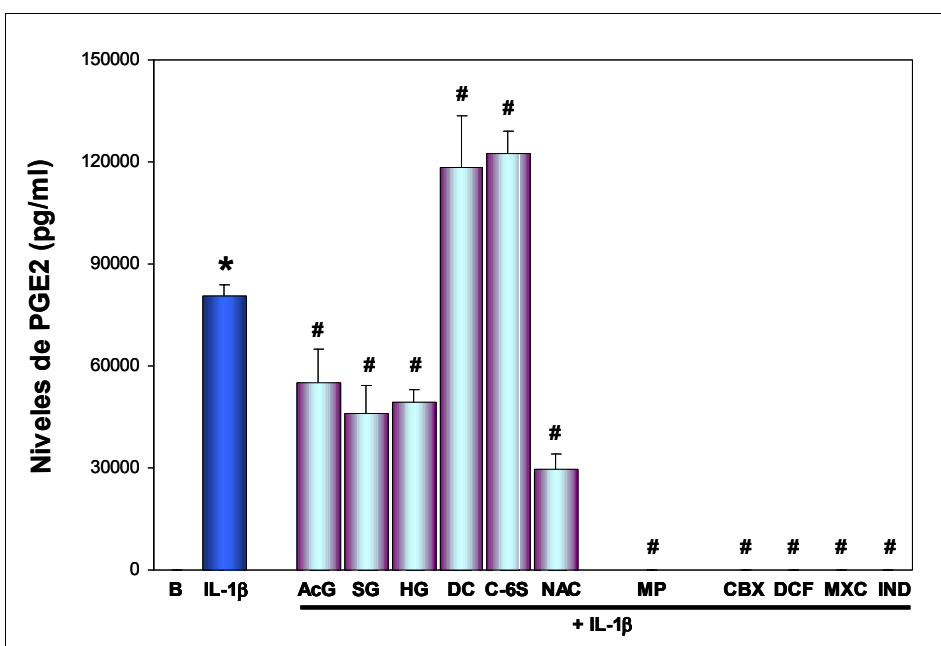


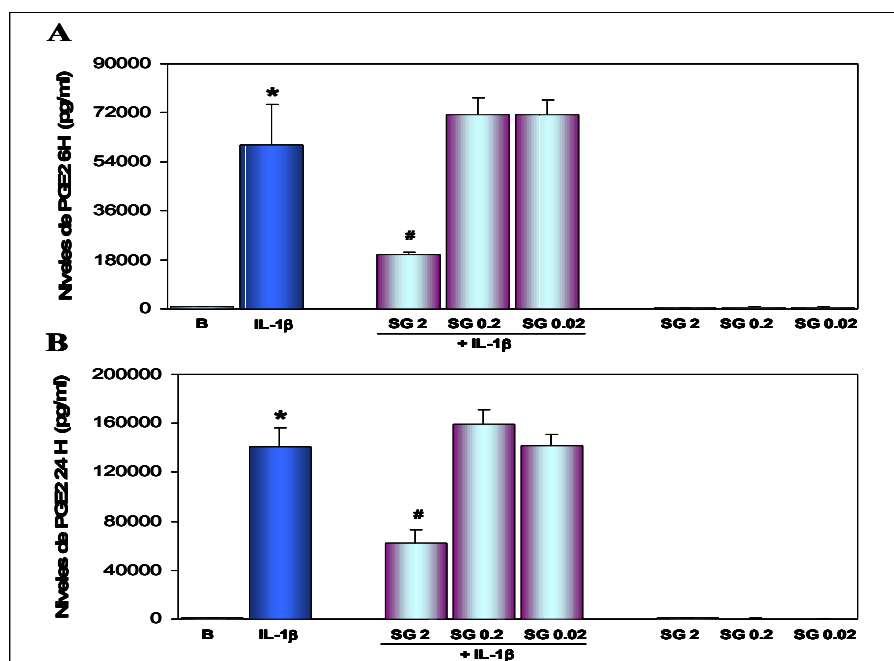
Figura 27. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1β en sinoviocitos humanos. Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1β (10 u/ml) durante 24 horas. La concentración de PGE<sub>2</sub> se muestra como Media±E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1β (n= 5-12).

en comparación a células no estimuladas). Así mismo, como era esperable, tanto la MP como todos los AINE incluidos en el estudio redujeron de forma drástica los niveles de la PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante celular de condrocitos estimulados con la IL-1β (en muchos casos los niveles de la PGE<sub>2</sub> no fueron detectables), no solo en comparación a células estimulas con IL-1β, sino en

comparación también a los niveles de PGE<sub>2</sub> encontrados en el sobrenadante de células estimuladas con la citoquina y tratadas con la AcG, el SG y el HG (Figura 26).

En cuanto a los sinoviocitos, los resultados obtenidos fueron similares a los observados en condrocitos. El incremento en la producción de PGE<sub>2</sub> observado tras la estimulación de las células con la IL-1 $\beta$  fue revertido por los tres compuestos de glucosamina utilizados (AcG, SG y HG) (inhibición del 32, 45 y 40%;  $p= 0.013, 0.001$  y  $0.001$  respectivamente) así como por la NAC (63% de inhibición,  $p= 0.001$ ). La DC y el C-6S no solo no disminuyeron los niveles de PGE<sub>2</sub> sino que provocaron un incremento aún mayor al inducido por la IL-1 $\beta$  en la liberación de este mediador al sobrenadante celular ( $p= 0.005$  y  $0.001$ , respectivamente. Figura 27). Finalmente como podemos observar en la figura 27 el corticoesteroide MP así como todos los AINE utilizados en los experimentos inhibieron de forma significativa la liberación de la PGE<sub>2</sub> al sobrenadante de sinoviocitos estimulados con IL-1 $\beta$  (en muchos casos los niveles de la PGE<sub>2</sub> no fueron detectables). Por último, al igual que observamos en condrocitos, esta inhibición fue significativa también con respecto al efecto de la AcG, el SG, el HG y la NAC en células estimuladas con la IL-1 $\beta$ .

A continuación quisimos estudiar si dosis inferiores del SG (0.2 mM y 0.02 mM) a las utilizadas en el apartado anterior eran capaces de controlar la liberación de la PGE<sub>2</sub> al sobrenadante celular inducida por la IL-1 $\beta$ . Para ello, medimos la concentración del mediador en el sobrenadante de los condrocitos que se incubaron durante 6 ó 24 horas con la IL-1 $\beta$  en presencia o ausencia del SG.



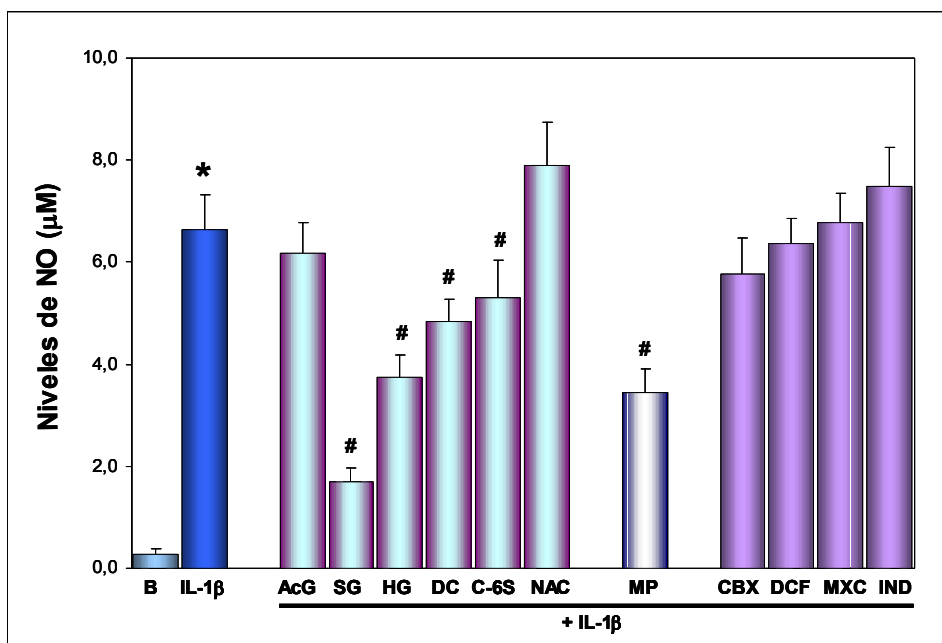
**Figura 28. Efecto del SG sobre la síntesis de la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con las diferentes dosis de SG (2 a 0.02 mM) y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 6 ó 24 horas. La concentración de PGE<sub>2</sub> se muestra como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.01$  vs B; # $p<0.01$  vs. IL-1 $\beta$  (n= 5-12).

Al igual que se había observado en los experimentos anteriormente realizados, la estimulación con la IL-1 $\beta$  dio lugar a un incremento en la liberación de la PGE<sub>2</sub> que fue dependiente del tiempo de estimulación. Sin embargo, solo la dosis más alta del SG (2 mM) consiguió disminuir los

niveles del mediador inducidos por la IL-1 $\beta$  tanto a las 6 como a las 24 horas de incubación ( $p= 0.012$  y  $0.002$ , respectivamente). (Figura 28).

### 3.3 Efecto de los fármacos sobre la producción del NO.

Otro mediador inflamatorio que se encuentra incrementado en procesos inflamatorios es el NO, por lo que quisimos evaluar el efecto de las diferentes fármacos utilizados en este trabajo sobre la liberación de NO al sobrenadante celular tras estimular las células con la IL-1 $\beta$  durante 24 horas tanto en condrocitos como en sinoviocitos. La estimulación con la IL-1 $\beta$  provocó un incremento en la concentración del NO medida en el sobrenadante celular de condrocitos tras 24 horas de estimulación (Figura 29).



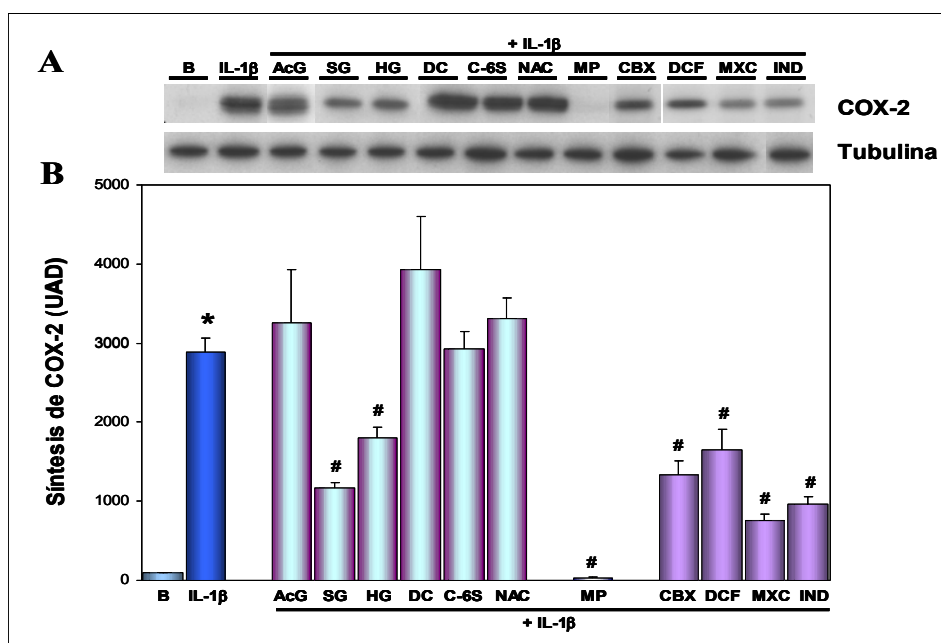
**Figura 29. Efecto de los fármacos sobre la síntesis del NO inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. La concentración de NO se muestra como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1 $\beta$  ( $n= 10-17$ ).

La incubación de las células con el SG, el HG, la DC o el C-6S ( $p= 0.001$ ,  $0.001$ ,  $0.040$  y  $0.045$ , respectivamente) revertió el incremento en la liberación del NO inducido por la IL-1 $\beta$ , mientras que la presencia de la AcG y de la NAC no modificaron los niveles de NO observados tras la estimulación con la citoquina (Figura 29). Con respecto al resto de los fármacos, la MP disminuyó de forma significativa los niveles de NO en el sobrenadante celular ( $p= 0.001$ ) mientras que ninguno de los AINE utilizados (CBX, DCF, MXC o IND) fueron capaces de modificar la liberación de NO inducida por la presencia de la IL-1 $\beta$  en el sobrenadante celular de condrocitos humanos (Figura 29).

En cuanto a sinoviocitos, la estimulación de las células con la IL-1 $\beta$  no incrementó la liberación de NO al sobrenadante celular. Además, los sinoviocitos, tanto en estado basal como incubados con los diferentes fármacos empleados en los experimentos, no liberaron cantidades detectables de NO al sobrenadante celular.

### 3.4 Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la COX-1 y la COX-2.

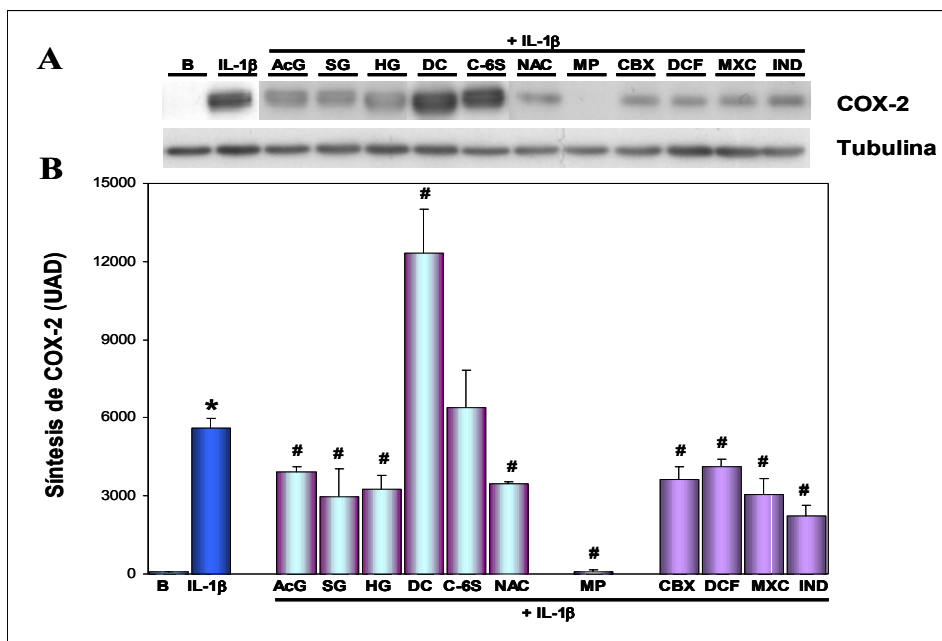
A continuación quisimos estudiar el efecto de la depleción de PGE<sub>2</sub> endógena sobre la expresión de la COX-2 en condrocitos y sinoviocitos humanos en cultivo. En los experimentos *in vitro* realizados observamos que la estimulación con la IL-1 $\beta$  incrementaba los niveles proteicos de COX-2, tanto en sinoviocitos como en condrocitos, entre 29 y 55 veces en comparación a células no estimuladas (Figura 30 y 31). Los resultados de estos experimentos demostraron que solo dos de los compuestos de glucosamina, SG y HG, fueron capaces de inhibir la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos ( $p= 0.004$  y  $0.022$ , respectivamente). Ninguno de los otros SYSADOA incluidos en estos experimentos (AcG, DC y C-6S) así como tampoco la NAC modificaron de forma significativa los niveles de esta enzima. Por otro lado, tanto la MP como todos los inhibidores de la COX (CBX, DCF, MXC e IND) empleados en el estudio redujeron el incremento en los niveles de la proteína COX-2 en condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.004$  en todos los casos, figura 30).



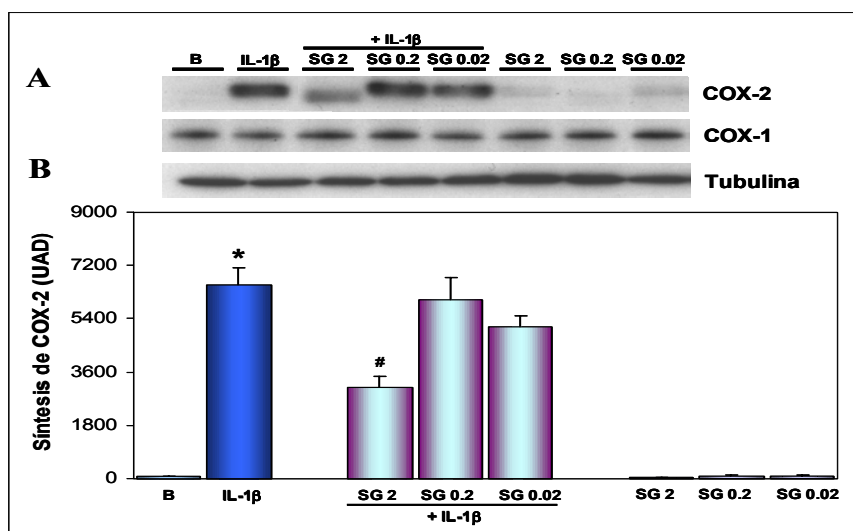
**Figura 30. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a las señales para COX-2 y  $\alpha$ -tubulina. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de COX-2 con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1  $\beta$  (n= 3-12).

Los experimentos realizados con sinoviocitos demostraron que la presencia de los tres compuestos de glucosamina (AcG, SG y HG) así como de la NAC inhibió de forma significativa la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.016$ ,  $0.047$ ,  $0.025$  y  $0.014$ , respectivamente) (Figura 31). Por otro lado la DC en sinoviocitos no solo no disminuyó los niveles de la proteína de COX-2 sino que indujo un incremento estadísticamente significativo en la síntesis de esta enzima en comparación a células incubadas solo con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.013$ ). Por último, al igual que se había observado en condrocitos, tanto la MP como todos los inhibidores de la COX (CBX, DCF, MXC e IND) empleados en los experimentos fueron capaces de disminuir de forma significativa el incremento en la síntesis de

la COX-2 inducido por la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos (p= 0.001, 0.022, 0.005, 0.008 y 0.002 respectivamente) (Figura 31).



**Figura 31. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a las señales para COX-2 y  $\alpha$ -tubulina. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de COX-2 con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1 $\beta$  (n= 3-16).

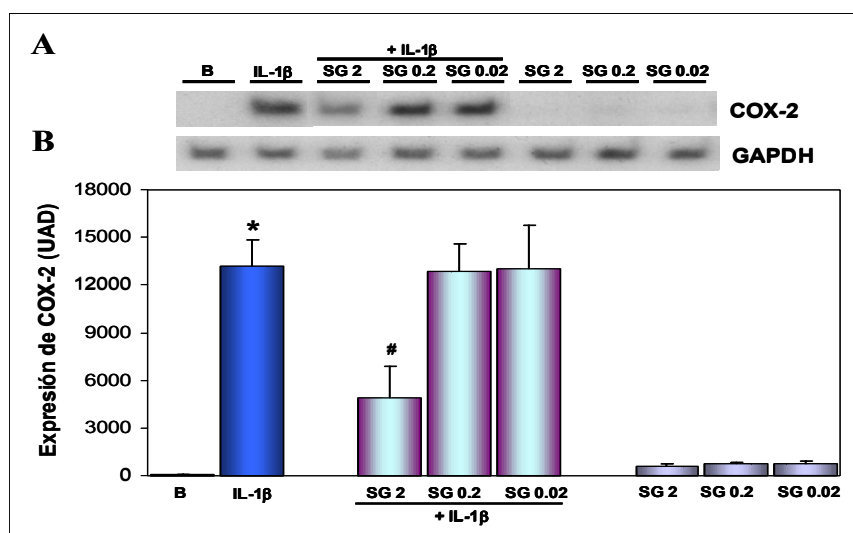


**Figura 32. Efecto del SG sobre la síntesis de COX-1 y COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con las diferentes dosis de SG (2 a 0.02 mM) y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a las señales para COX-1, COX-2 y  $\alpha$ -tubulina. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de COX-2 con respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1 $\beta$  (n= 3-4).

A continuación realizamos otros experimentos para estudiar el efecto del SG en la síntesis de la COX-2. Para ello estudiamos el efecto de este azúcar a diferentes concentraciones (2, 0.2 y 0.02 mM) sobre la síntesis de las proteínas COX-1 y COX-2 inducida por la estimulación de los condrocitos

humanos con la IL-1 $\beta$  durante 24 horas. Los resultados de estos experimentos demostraron que la presencia del SG inhibe la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  a la dosis de 2 mM. Sin embargo, como se muestra en la figura 32, ni la IL-1 $\beta$  ni el SG modificaron la síntesis de la COX-1.

También investigamos si el SG era capaz de inhibir la síntesis de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos en cultivo a través de la inhibición de la expresión génica de la COX-2. La figura 33 muestra que la presencia del SG (2 mM) fue capaz de inhibir significativamente el incremento en la expresión de la COX-2 inducido por la IL-1 $\beta$  ( $p=0.029$ ).



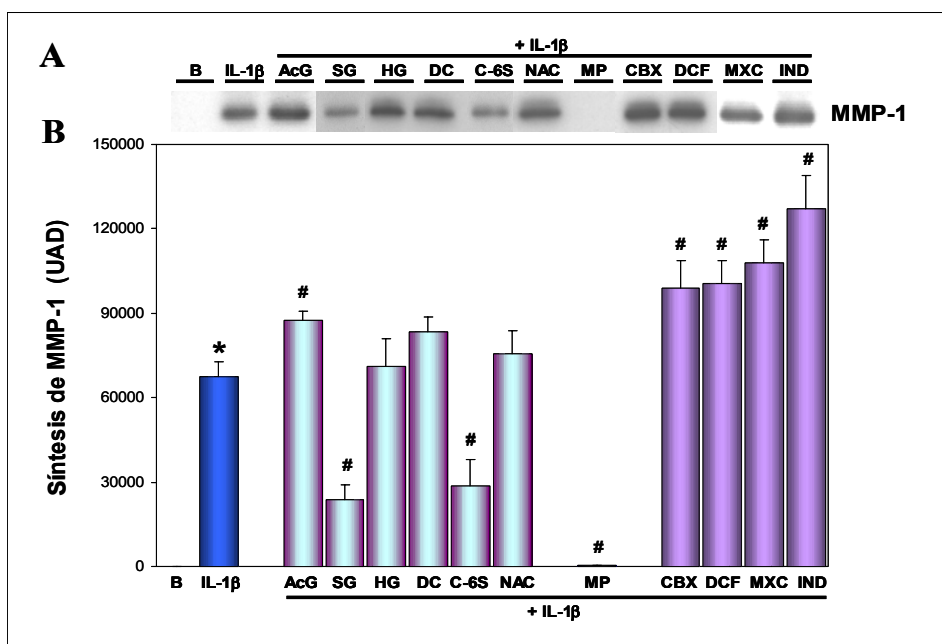
**Figura 33. Efecto del SG sobre la expresión de la COX-2 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con las diferentes dosis de SG (2 a 0.02 mM) y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Experimento de RT-PCR representativo correspondiente a las señales para COX-2 y GAPDH. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos en la expresión de COX-2 con respecto a la expresión de GAPDH. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1 $\beta$  (n= 4-7).

### 3.5 Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-1 y la MMP-13.

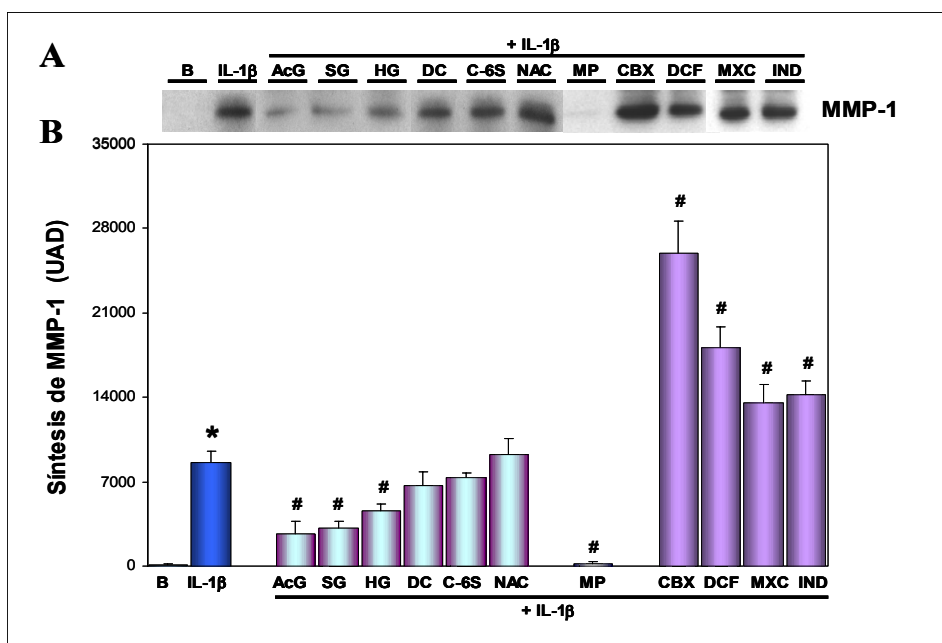
Las MMP son un grupo de enzimas que se encuentran incrementadas en la OA y que juegan un papel fundamental en la destrucción del cartílago articular que acontece en esta enfermedad. Por lo tanto, quisimos estudiar el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena sobre la activación de la MMP-1 y la MMP-13 tanto de condrocitos como de sinoviocitos estimulados con la IL-1 $\beta$ .

Observamos que la citoquina inducía en ambos tipos celulares un incremento significativo en los niveles de la MMP-1 en el medio de cultivo (alrededor de 84000% y 6400%, respectivamente) (Figura 34 y 35). Cuando los condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  los preincubamos con los fármacos incluidos en el estudio observamos que solo el SG y el C-6S fueron capaces de disminuir de forma significativa la liberación de la MMP-1 al sobrenadante celular ( $p=0.001$  y  $0.008$ , respectivamente, Figura 34). Por otro lado mientras que el HG, la DC y la NAC no fueron capaces de modificar la síntesis de la enzima, la AcG incrementó de forma significativa los niveles de la MMP-1 ya de por sí incrementados por la estimulación de las células con la IL-1 $\beta$  ( $p=0.030$ , figura 34). En cuanto al resto de los fármacos empleados en los experimentos, el tratamiento con la MP disminuyó de forma drástica la producción de la MMP-1 al final del periodo de incubación ( $p=0.001$ ), mientras que los

AINE (CBX, DCF, MXC e IND) incrementaron de forma significativa la liberación de la enzima en condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.030, 0.008, 0.008$  y  $0.004$ , respectivamente. Figura 34).



**Figura 34. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-1 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a la señal para MMP-1. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de MMP-1. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1 $\beta$  (n= 4-9).

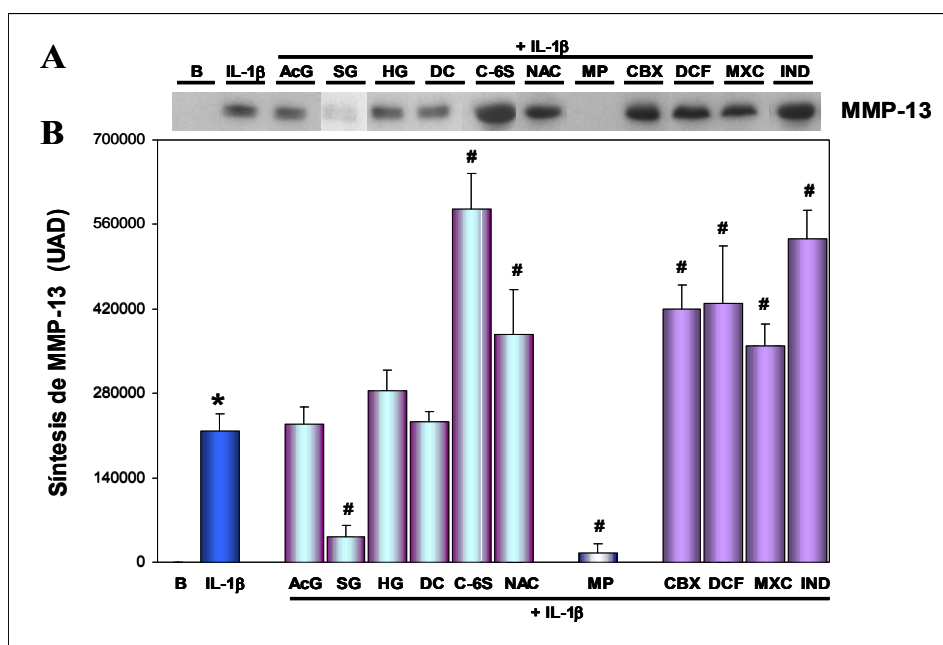


**Figura 35. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-1 inducida por la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a la señal para MMP-1. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de MMP-1. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1 $\beta$  (n= 3-9).



En cuanto a los sinoviocitos, todos los compuestos de glucosamina utilizados (AcG, SG y HG) disminuyeron significativamente la síntesis de la MMP-1 en células estimuladas con la IL-1 $\beta$  ( $p=0.017$ ,  $0.006$  y  $0.008$ , respectivamente. Figura 35). En cambio, la DC, el C-6S y la NAC no modificaron la liberación de la colagenasa, mientras que el tratamiento con la MP provocó una inhibición casi completa de la síntesis de la enzima en comparación a células estimuladas con la IL-1 $\beta$  ( $p=0.001$ . Figura 35). Finalmente, al igual que habíamos observado en condrocitos, los AINE (CBX, DCF, MXC e IND) no solo no disminuyeron los niveles de la MMP-1 sino que provocaron un incremento significativo en la liberación de la enzima en comparación a sinoviocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p=0.017$ ,  $0.003$ ,  $0.018$  y  $0.005$ , respectivamente. Figura 35).

En cuanto a la otra colagenasa estudiada en esta parte de la tesis observamos que tanto en células no estimuladas como en aquellas incubadas con la IL-1 $\beta$ , la síntesis de la MMP-13 fue mayor en condrocitos que en sinoviocitos. La IL-1 $\beta$  indujo un incremento significativo de la liberación de la enzima tanto en condrocitos como en sinoviocitos (alrededor de 46000% y 64%, respectivamente. Figura 36 y 37).

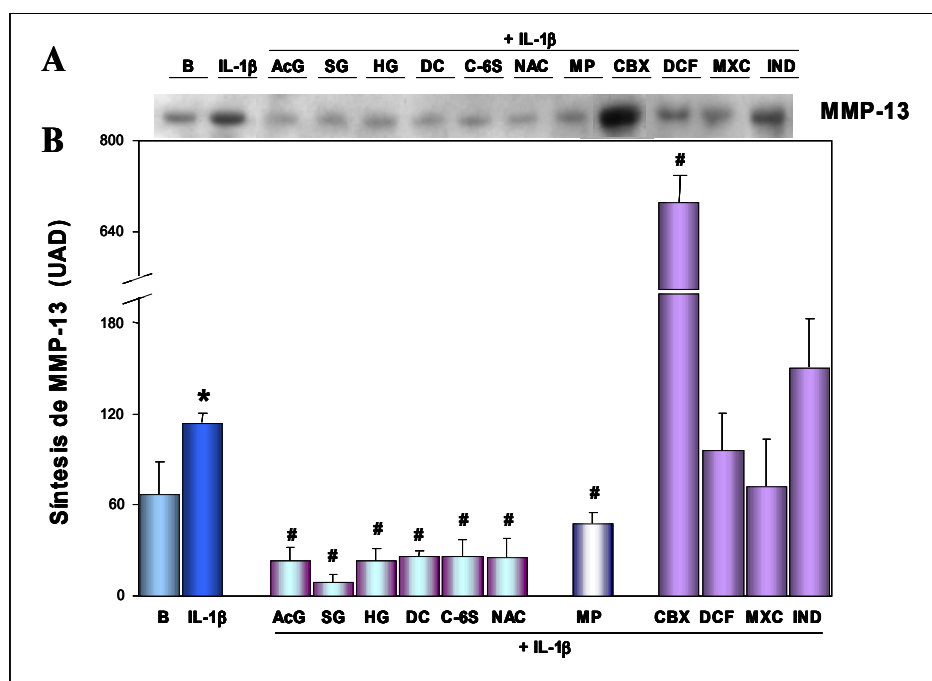


**Figura 36. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-13 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a la señal para MMP-13. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de MMP-13. Los resultados se muestran como Media $\pm$ E.E.M. \* $p<0.05$  vs B; # $p<0.05$  vs. IL-1 $\beta$  (n= 4-9).

En los experimentos realizados en condrocitos observamos que el SG era capaz de disminuir el incremento en la síntesis de la MMP-13 inducido por la IL-1 $\beta$  ( $p=0.004$ ), mientras que los otros dos compuestos de glucosamina (AcG y HG) así como la DC no demostraron tener ningún efecto sobre la liberación de la colagenasa al medio de cultivo inducida por la IL-1 $\beta$  (Figura 36). El C-6S y la NAC incrementaron de forma significativa los niveles de la MMP-13 en el sobrenadante celular en comparación a condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p=0.002$  y  $0.028$ , respectivamente. Figura 36). Finalmente y al igual que observamos en el caso de la MMP-1, el tratamiento con la MP provocó una

inhibición casi completa de la liberación de la enzima al medio de cultivo, mientras que el tratamiento con los diferentes AINE (CBX, DCF, MXC e IND) incrementó significativamente los niveles de la enzima presentes en el sobrenadante celular en comparación a condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.003, 0.043, 0.048$  y  $0.001$ , respectivamente. Figura 36).

En lo que se refiere a los sinoviocitos, todos los fármacos incluidos en el grupo de los SYSADOA, así como la NAC y la MP disminuyeron de forma significativa la liberación de la MMP-13 al sobrenadante celular inducida por la IL-1 $\beta$  ( $p < 0.016$  en todos los casos. Figura 37). En lo que se refiere a los AINE empleados en los experimentos, el DCF, el MXC y la IND no fueron capaces de modificar de forma significativa la liberación de la MMP-13 en células estimuladas con la IL-1 $\beta$ . Sin embargo, el otro AINE utilizado en los experimentos, el CBX, no solo no disminuyó la síntesis de la MMP-13 sino que incrementó significativamente los niveles de la colagenasa en el medio de cultivo en comparación a sinoviocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.008$ . Figura 37).

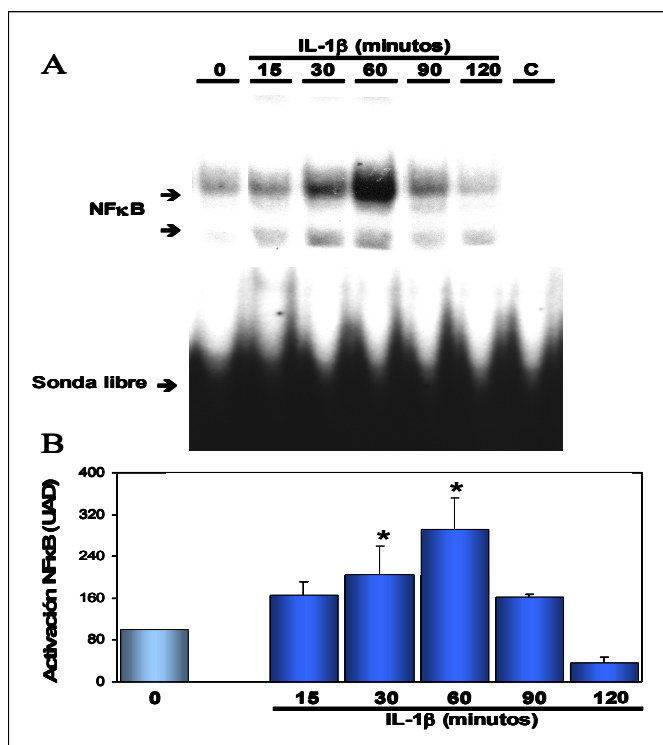


**Figura 37. Efecto de los fármacos sobre la síntesis de la MMP-13 inducida por la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 1 hora con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Western blot representativo correspondiente a la señal para MMP-13. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la síntesis de MMP-13. Los resultados se muestran como Media  $\pm$  E.E.M. \* $p < 0.05$  vs B; # $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$  (n = 3-9).

### 3.6 Efecto de los fármacos sobre la activación del NF $\kappa$ B.

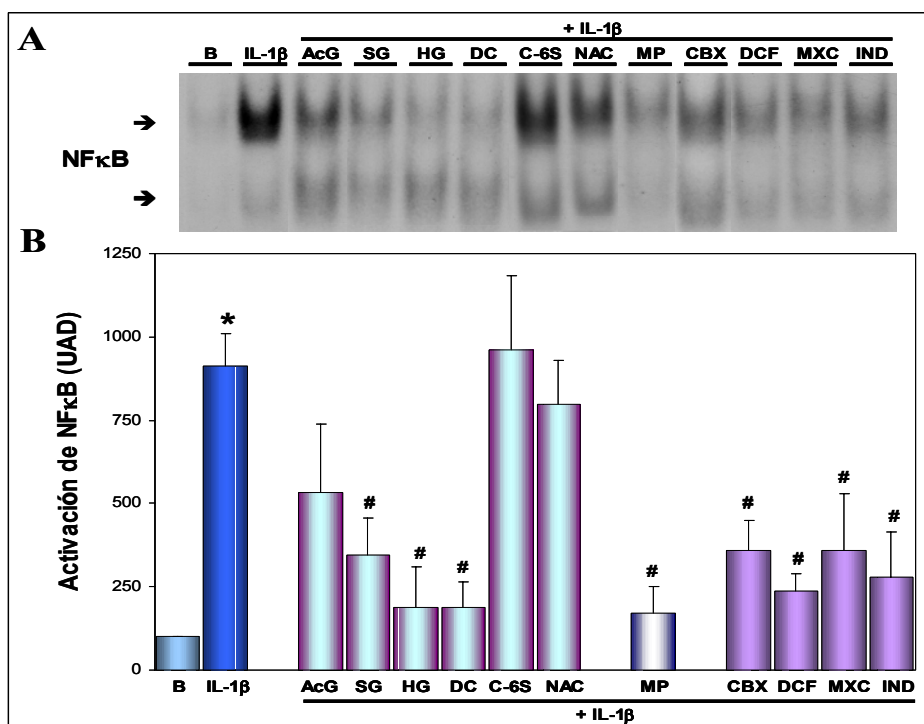
El NF $\kappa$ B es un factor nuclear que se une de forma específica a sus secuencias consenso en el ADN. Existen sitios de unión para NF $\kappa$ B en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la fisiopatología de la OA, como son COX-2, iNOS y algunas MMP (Tak PP, 2001; Bond M, 1999). En esta parte de la tesis nos propusimos estudiar si la modulación de este factor nuclear estaba implicada en el efecto que algunos de los fármacos ejercían sobre los diferentes mediadores del catabolismo celular estudiados anteriormente.

En primer lugar evaluamos el efecto de la IL-1 $\beta$  sobre la unión al ADN del NF $\kappa$ B, para lo cual estimulamos los condrocitos humanos con la IL-1 $\beta$  durante diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos). Mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética observamos que la estimulación con la IL-1 $\beta$  provocó una activación del factor NF $\kappa$ B que fue dependiente del tiempo de incubación. La máxima respuesta se observó a los 60 minutos (Figura 38). Esta reacción de unión fue específica, como demuestra la ausencia de banda cuando la mezcla de reacción se incubó con un exceso de oligo sin marcar (Figura 38, carril C). Establecimos que 60 minutos era el tiempo óptimo de incubación para medir la activación del factor NF $\kappa$ B.

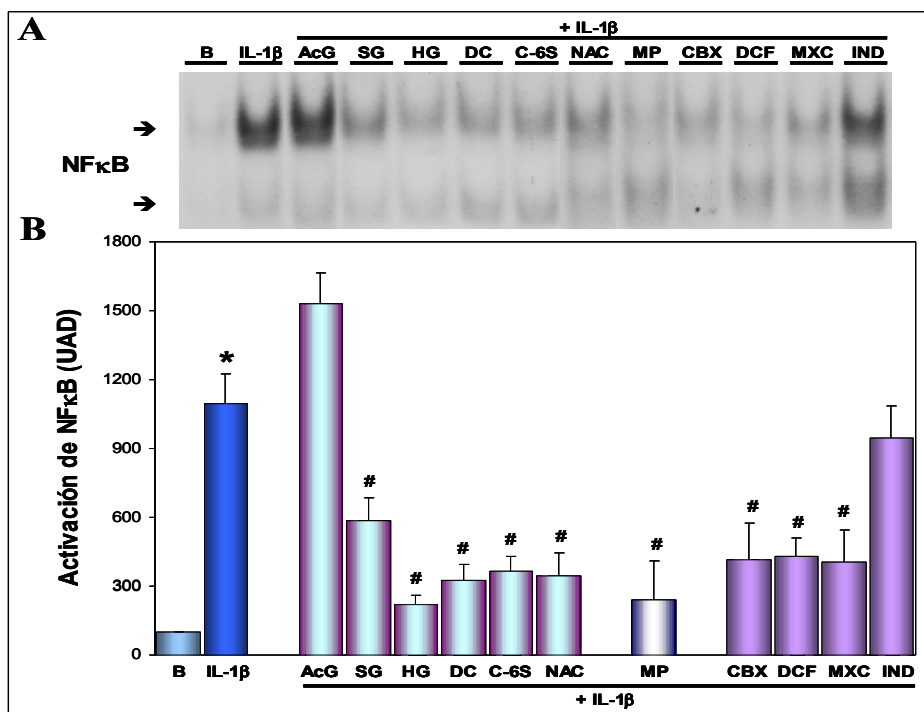


**Figura 38. La IL-1 $\beta$  activa la unión al ADN del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) en condrocitos humanos en cultivo.** Las células se incubaron durante 15, 30, 60, 90 y 120 minutos con 10 u/ml de IL-1 $\beta$ . (A) Se muestra una autorradiografía representativa de cuatro experimentos diferentes con resultados similares. La especificidad del ensayo se asegura mediante ensayos de competición en los que un exceso de sonda sin marcar anuló la señal de NF $\kappa$ B (línea C). Las posiciones en el gel de los complejos de NF $\kappa$ B están indicadas por las flechas. (B) Resultado del análisis densitométrico de los gels de la activación de NF $\kappa$ B. Los resultados se muestran como Media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$  vs. 0 minutos de incubación ( $n=3$ ).

La IL-1 $\beta$  incrementó de forma significativa la unión del NF $\kappa$ B a sus secuencias consenso tanto en condrocitos como en sinoviocitos tras 60 minutos de incubación (Figura 39 y 40). En los experimentos realizados con condrocitos observamos que el SG, el HG y la DC inhibían significativamente la activación del NF $\kappa$ B inducida por la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.007$ ,  $0.017$  y  $0.001$ , respectivamente. Figura 39), mientras que la AcG, el C-6S y la NAC no fueron capaces de modificar la activación del factor nuclear inducida por la citoquina (Figura 40). En cuanto a los otros fármacos utilizados, la coincubación de la MP y la IL-1 $\beta$  provocó una inhibición significativa de la unión del NF $\kappa$ B inducida por la citoquina ( $p= 0.001$ . Figura 39). Finalmente, todos los AINE incluidos en el estudio (el CBX, el DCF, el MXC y la IND) disminuyeron de forma significativa la activación de NF $\kappa$ B



**Figura 39. Efecto de los fármacos sobre la activación del NFκB inducida por la IL-1 β en condrocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 60 minutos con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 β (10 u/ml) durante 60 minutos. (A) Autorradiografía representativa correspondiente a la señal para NFκB. Las posiciones en el gel de los complejos de NFκB están indicadas por las flechas. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la activación de NFκB. Los resultados se muestran como Media±E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1 β (n= 3-14).

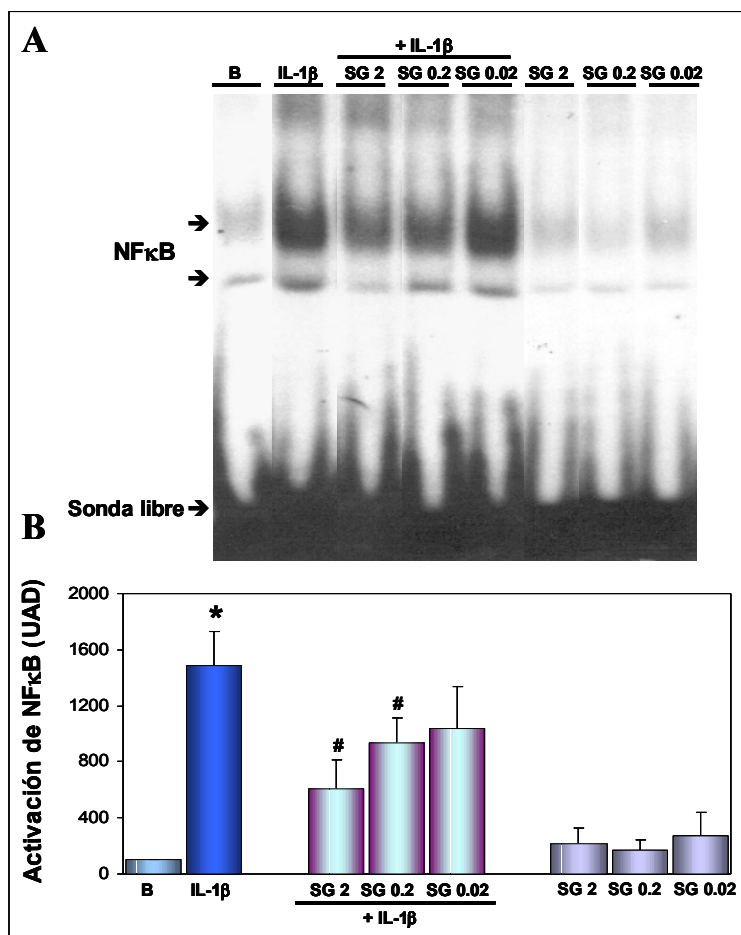


**Figura 40. Efecto de los fármacos sobre la activación del NFκB inducida por la IL-1 β en sinoviocitos humanos.** Las células se preincubaron durante 60 minutos con los diferentes fármacos y luego se estimularon con IL-1 β (10 u/ml) durante 60 minutos. (A) Autorradiografía representativa correspondiente a la señal para NFκB. Las posiciones en el gel de los complejos de NFκB están indicadas por las flechas. (B) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos de la activación de NFκB. Los resultados se muestran como Media±E.E.M. \*p<0.05 vs B; #p<0.05 vs. IL-1 β (n= 3-14).

en condrocitos humanos estimulados con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.001, 0.001, 0.035$  y  $0.012$ , respectivamente. Figura 39).

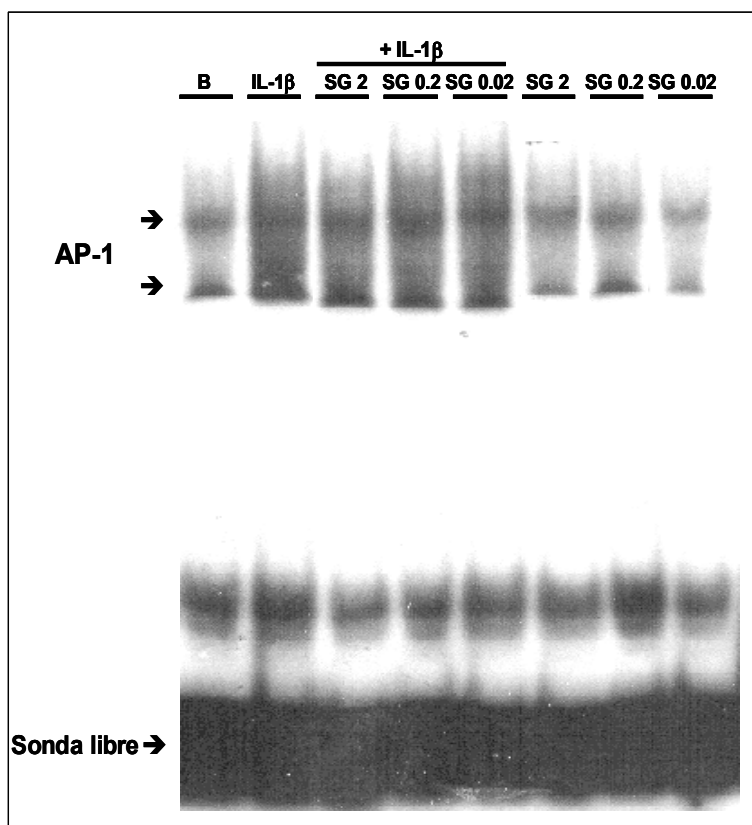
En cuanto a los sinoviocitos, el tratamiento con el SG, el HG, la DC, el C-6S, la NAC y la MP disminuyó de forma significativa la unión del NF $\kappa$ B a sus secuencias consenso en células estimuladas con la IL-1 $\beta$  ( $p= 0.02, 0.001, 0.004, 0.001, 0.004$  y  $0,029$ , respectivamente. Figura 40). En cuanto a los AINE, exceptuando la IND que no fue capaz de modificar la activación del factor nuclear, tanto el CBX como el DCF y el MXC disminuyeron significativamente la unión del NF $\kappa$ B a sus secuencias consenso inducida por la estimulación con la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos ( $p= 0.02, 0.001$  y  $0.001$ , respectivamente. Figura 40).

A continuación realizamos otros experimentos en los que preincubamos los condrocitos humanos con tres dosis diferentes de SG (2, 0.2 y 0.02 mM). Como se muestra en la figura 41 la presencia del SG sólo no modificó la actividad del factor NF $\kappa$ B. Sin embargo el SG inhibió de forma dosis dependiente el incremento en la activación del factor nuclear inducido por IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos tanto a la dosis de 2 mM como de 0.2 mM ( $p= 0.042$  y  $0.045$ , respectivamente. Figura 41).



**Figura 41. Efecto del SG sobre la activación del NF $\kappa$ B inducida por la IL-1 $\beta$ .** Los condrocitos se preincubaron durante 60 minutos con diferentes concentraciones de SG (0.02 a 2 mM) y posteriormente se estimularon con IL-1 $\beta$ . (A) Autorradiografía representativa de cuatro experimentos diferentes con resultados similares. Las posiciones en el gel de los complejos de NF $\kappa$ B están indicadas por las flechas. (B) Resultado del análisis densitométrico de los gels de la activación de NF $\kappa$ B. Los resultados se muestran como Media  $\pm$  EEM. \*  $p<0.05$  vs. 0 minutos de incubación ( $n=3-10$ ).

Para verificar si el efecto inhibitorio del SG era específico para el NF $\kappa$ B, analizamos si la activación del factor nuclear AP-1, también inducido por la IL-1 $\beta$ , puede ser modificada por la presencia en el medio de diferentes dosis del SG en condrocitos humanos. Extractos similares a los que se utilizaron para medir la activación del NF $\kappa$ B se emplearon para medir la actividad de AP-1. Estos estudios demostraron que el SG no es capaz de modificar la actividad de AP-1 inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos a ninguna de las dosis utilizadas (Figura 42).

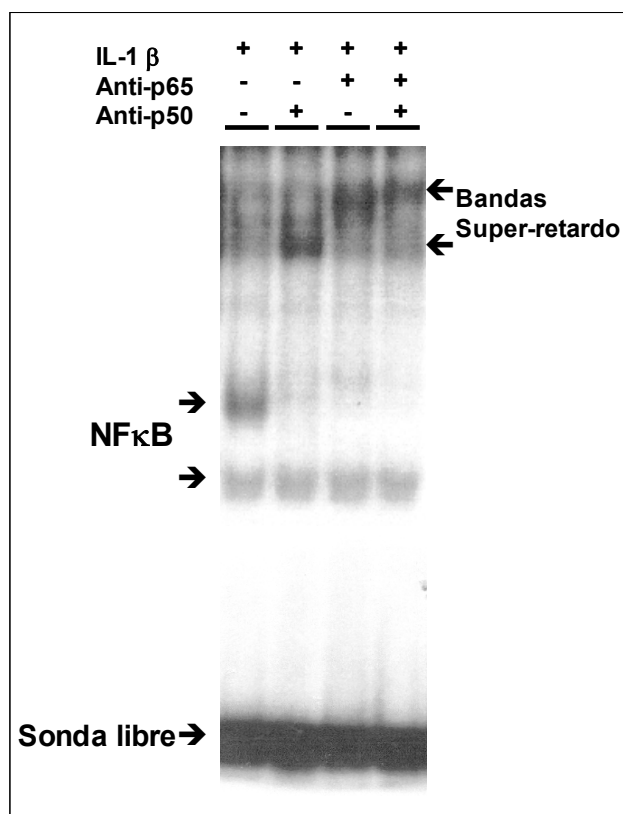


**Figura 42. Efecto del SG sobre la activación de AP-1 inducida por la IL-1 $\beta$ .** Los condrocitos se preincubaron durante 60 minutos con diferentes concentraciones de SG (0.02 a 2 mM) y posteriormente se estimularon con IL-1 $\beta$ . Autorradiografía representativa de cuatro experimentos diferentes con resultados similares. Las posiciones en el gel de los complejos de AP-1 están indicadas por las flechas.

### 3.7 Caracterización de las subunidades de la familia NF $\kappa$ B/Rel implicadas en la activación del NF $\kappa$ B inducida por la IL-1 $\beta$ en condrocitos humanos.

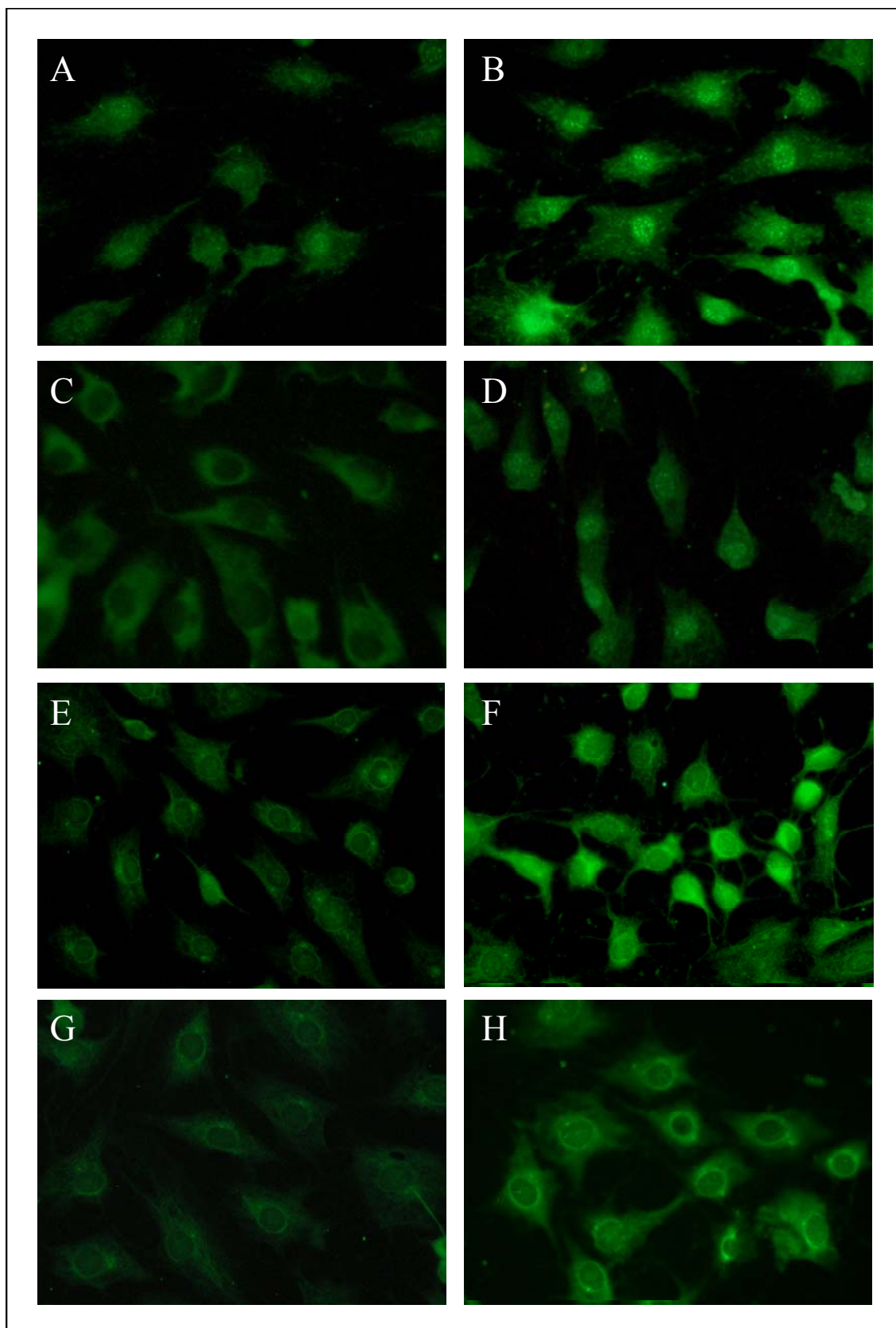
Después de observar que la estimulación con la IL-1 $\beta$  daba lugar a un incremento de la activación del NF $\kappa$ B tanto en condrocitos como en sinoviocitos y que dicha estimulación era parcialmente revertida por algunos de los fármacos utilizados en los experimentos *in vitro*, quisimos caracterizar las subunidades de la familia NF $\kappa$ B/Rel implicadas en la activación del factor nuclear en condrocitos humanos. Como se puede observar en la figura 43 los extractos nucleares procedentes de células estimuladas con la IL-1 $\beta$  dieron lugar a dos bandas en los ensayos de EMSA. Mediante la utilización de anticuerpos específicos para dos miembros diferentes de la familia de proteínas NF $\kappa$ B/Rel (anti p50 y anti p65) analizamos la composición de los complejos NF $\kappa$ B procedentes de

condrocitos humanos estimulados con la IL-1 $\beta$  y observamos que la presencia de los anticuerpos provocaba la aparición de complejos más grandes con una movilidad electroforética menor (complejos super-retardados) (Figura 43). De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de super-retardo podemos afirmar que la banda mayoritaria de los complejos NF $\kappa$ B que aparecía en nuestros experimentos (la de mayor tamaño) correspondía al heterodímero p50/p65, mientras que la banda minoritaria no contenía ninguna de estas dos subunidades del complejo NF $\kappa$ B (Figura 43).



**Figura 43. Determinación de las subunidades del NF $\kappa$ B implicadas en su activación por la IL-1 $\beta$ .** Los extractos nucleares se preincubaron con anticuerpos frente a las subunidades p50 y p65 y posteriormente la mezcla se separó por EMSA para comprobar la activación de NF $\kappa$ B. Las bandas de super-retardo (correspondientes a la banda mayoritaria del complejo NF $\kappa$ B) se observaron tanto con anti-p50 como con anti-p65.

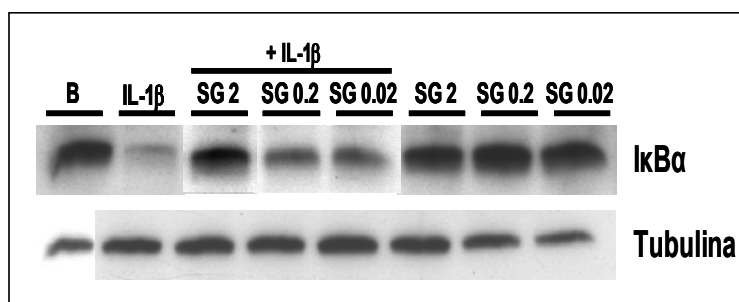
A continuación mediante inmunofluorescencia quisimos localizar las subunidades p50 y p65 en condrocitos humanos en cultivo. Los resultados de estos experimentos nos mostraron una tinción citoplásmica difusa para ambas proteínas en condiciones basales. Sin embargo, tras estimular los condrocitos con la IL-1 $\beta$  aparecía un claro patrón de tinción nuclear tanto para p50 como para p65, indicando la translocación al núcleo de las dos subunidades del complejo NF $\kappa$ B (Figura 44A, 44B, 44E y 44F). Además gracias a estos experimentos pudimos comprobar que la incubación de los condrocitos con el SG (2 mM) previno la translocación al núcleo tanto de p50 como de p65 inducida por la IL-1 $\beta$  (Figura 44D y 44H).



**Figura 44. Ensayos de inmunofluorescencia para las subunidades p50 (A-D) y p65 (E-H).** (A y E) Tinción en células no estimuladas para p50 y p65 respectivamente. (B y F) Tinción en células estimuladas con IL-1 $\beta$  durante 60 minutos para p50 y p65 respectivamente. (C y G) Tinción en células incubadas solo con SG (2 mM) p50 y p65 respectivamente. (D y H) Tinción en células preincubadas con SG (2 mM) y posteriormente estimuladas con IL-1 $\beta$  p50 y p65 respectivamente.



La activación del NF $\kappa$ B tiene lugar tras la disociación del complejo y la subunidad inhibitoria de la familia de proteínas I $\kappa$ B que se degrada por un proceso proteolítico. Por ello, a continuación estudiamos la implicación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  en la activación del NF $\kappa$ B en nuestros experimentos. Mediante Western blot observamos que en condiciones basales I $\kappa$ B $\alpha$  aparecía en el citoplasma de los condrocitos humanos como una proteína de aproximadamente 37 KDa. Tras la estimulación con la IL-1 $\beta$ , esta banda desapareció, sugiriendo que I $\kappa$ B $\alpha$  se degradaba al mismo tiempo que se producía la activación del NF $\kappa$ B (Figura 45). Sin embargo la preincubación de los condrocitos con el SG previno la desaparición de la banda de I $\kappa$ B $\alpha$  y por tanto su degradación (Figura 45).



**Figura 45. Efecto del SG sobre la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma de las células estimuladas con la IL-1 $\beta$ .** Los condrocitos se preincubaron durante 60 minutos con diferentes concentraciones de SG (0.02 a 2 mM) y posteriormente se estimularon con IL-1 $\beta$ . Autorradiografía representativa de seis experimentos diferentes con resultados similares.

## **V. DISCUSIÓN**

## 1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> EN LA ARTICULACIÓN ARTRÓSICA.

### 1.1 Efecto sobre la ruta de síntesis de los prostanoïdes.

Durante años la OA fue considerada como una enfermedad no inflamatoria. Sin embargo, se ha observado que la inflamación de la membrana sinovial juega un importante papel en la progresión de la OA (Pelletier JP, 2001a; Pelletier JP, 2001b; Saito I, 2002). Un estudio ecográfico ha demostrado que el 70% de los pacientes con artrosis de rodilla sintomática presenta sinovitis (Wakefield RJ, 1998). De hecho, la intensidad de la sinovitis (medida por artroscopía) se correlaciona con la gravedad del dolor en enfermos con OA de rodilla, y ambos procesos mejoran con el tratamiento con corticoides intraarticulares (Jones A, 1996). Varios autores han descrito lesiones inflamatorias importantes en el tejido sinovial, como el incremento de la vascularización, del infiltrado celular y del edema en el tejido subintimal, así como una hiperplasia de las células sinoviales de la íntima (Saito I, 2002) y parece que la inflamación sinovial y la concentración local de mediadores proinflamatorios está directamente implicada en la aparición del dolor en las rodillas artrósicas (Brandt KD, 1987; Nishimura M, 2002).

La PGE<sub>2</sub>, el eicosanoïde que se encuentra en mayor concentración en las articulaciones artrósicas (Goetzl EJ, 1995), modula varios de los principales procesos implicados en la destrucción progresiva del tejido en la OA, como son la activación de proteasas, la síntesis de proteínas de matriz, la proliferación/apoptosis celular, e incluso, la sensibilización a nociceptores (revisado en Martel-Pelletier J, 1994; Crofford LJ, 1999). En el líquido sinovial y en la membrana sinovial de los pacientes con OA se han detectado niveles incrementados de la PGE<sub>2</sub> (Sahap Atik O, 1990; Wittenberg RH, 1993). De hecho, la membrana sinovial parece ser la principal fuente de producción de la PGE<sub>2</sub> durante la OA (Wittenberg RH, 1993). En este estudio hemos demostrado que dos AINE utilizados en el tratamiento de la artrosis, el ACF y el CBX, mejoran el dolor y la función articular y disminuyen la concentración de la PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial de forma similar. Además, estos tratamientos inhiben la expresión génica y la síntesis de la COX-2 en la membrana sinovial de pacientes artrósicos, mientras que la expresión de la COX-1 no se altera. Nuestros datos muestran que tanto el ACF como el CBX disminuyen la producción de la PGE<sub>2</sub> no solo inhibiendo la actividad de la enzima, sino también mediante un efecto directo sobre la expresión génica y la síntesis de la COX-2. Creemos que este es el primer estudio *in vivo* que demuestra un efecto significativo de los AINE en la regulación de la COX-2 tisular en humanos. Estos datos coinciden con resultados publicados anteriormente en un estudio realizado en la membrana sinovial de ratas con artritis en las que se observó que la administración de IND y de un inhibidor selectivo de la COX-2 disminuyó significativamente la expresión de la ciclooxigenasa (Anderson GD, 1996). Estudios previos *in vitro* también han sugerido que la expresión de la COX-2 podría estar regulada por los AINE, aunque los resultados publicados en este sentido son contradictorios. En fibroblastos sinoviales en cultivo, varios tipos de fármacos antiinflamatorios (como dexametasona o nimesulide) inhibieron la síntesis de la COX-2 (Fahmi H, 2001), mientras que otros (como naproxeno, MXC o IND) no tuvieron ningún efecto (Fahmi H, 2001; Kojima F, 2004; Hardy MM, 2002). Sin embargo, un estudio reciente en células leucémicas humanas afirma que estas discrepancias podrían ser debidas tanto a diferencias en el

estímulo celular utilizado como a diferencias en la potencia de los AINE testados (Takada Y, 2004). Los autores de este trabajo demostraron que todos los AINE estudiados fueron capaces de inhibir la expresión de la COX-2 si se empleaban a una concentración lo suficientemente elevada (Takada Y, 2004).

El mecanismo por el cual la COX-2 podría estar inhibida en presencia de concentraciones bajas de la PGE<sub>2</sub> no se conoce. Sin embargo, la misma PGE<sub>2</sub> podría ser responsable, al menos en parte, de esta situación, ya que se ha demostrado que la PGE<sub>2</sub> estabiliza el ARNm de la COX-2 y promueve su traducción en las células sinoviales (Faour WH, 2001). Por lo tanto en presencia de concentraciones bajas de la PGE<sub>2</sub>, el ARNm de la COX-2 es menos estable. En este contexto, nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que la presencia de la PGE<sub>2</sub> incrementa la síntesis de la COX-2 en fibroblastos sinoviales en cultivo estimulados con la IL-1 $\beta$  (Largo R, 2004).

También evaluamos el efecto de los dos AINE, el CBX y el ACF, sobre la expresión de otra enzima implicada en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en situaciones inflamatorias, la mPGES-1. Esta enzima es responsable de la conversión final de la PGH<sub>2</sub> a la PGE<sub>2</sub> y se encuentra incrementada en la membrana sinovial y el cartílago de la articulación artrósica (Li X, 2005; Westman M, 2004) como en condrocitos y sinoviocitos estimuladas con diferentes citoquinas (Masuko-Hongo K, 2004; Kojima F, 2004). Esta enzima está implicada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria así como en otros efectos producidos por la PGE<sub>2</sub>. Saha *et al.* observaron que ratones con una delección en el gen que codifica para la mPGES-1 no desarrollaban fiebre ni sintetizaban PGE<sub>2</sub> en el sistema nervioso central en respuesta a una inyección de lipopolisacárido bacteriano (Saha S, 2005). Nuestros datos demuestran que el tratamiento con el CBX disminuyó significativamente la expresión génica de la mPGES-1 en la membrana sinovial de pacientes artrósicos, mientras que el efecto del ACF no fue estadísticamente significativo. Estos resultados coinciden con estudios *in vitro* previos en los que se observó que el tratamiento de fibroblastos sinoviales con inhibidores selectivos de la COX-2 (rofecoxib, NS-398 y MXC) disminuía la expresión y síntesis de la mPGES-1 tras la estimulación con la IL-1 $\beta$ . Además estos investigadores observaron que la adición de PGE<sub>2</sub> exógena era capaz de revertir la disminución en la expresión de la enzima (Kojima F, 2003). Estos datos junto con los resultados de nuestros estudios *in vivo*, sugieren que los inhibidores de la COX-2 son capaces de disminuir la producción de la PGE<sub>2</sub> no solo mediante la inhibición de la ciclooxigenasa sino también mediante la inhibición de la expresión y síntesis de la mPGES-1 y la COX-2.

La PGE<sub>2</sub> produce diferentes efectos sobre las células de forma que puede tener propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias. Esta variedad en los efectos que provoca podría explicarse en parte por la existencia de cuatro receptores diferentes para este mediador denominados EP-1, EP-2, EP-3 y EP-4. Estos receptores están acoplados a diferentes rutas de señalización intracelular, lo que podría ser la causa del amplio espectro de efectos atribuidos a la PGE<sub>2</sub>. Parece que la PG podría tener diferentes efectos dependiendo del contexto de activación y de la población celular. Por ejemplo, se ha descrito que la PGE<sub>2</sub> a través del receptor EP-4 podría presentar efectos antiinflamatorios al suprimir la producción de quimioquinas en macrófagos humanos (Takayama K, 2002) y proinflamatorios al aumentar la expresión de la mPGES-1 en fibroblastos sinoviales (Kojima F, 2003). En nuestros estudios *in vivo* observamos que en el tejido sinovial procedente de pacientes

con OA de rodilla se expresan los receptores EP-2, EP-3 y EP-4, aunque no EP-1, como ya se había visto previamente en sinoviocitos en cultivo procedentes de pacientes con OA o AR (Inoue H, 2002). Sin embargo, ninguno de los tratamientos fue capaz de modificar la expresión de estos receptores. Por tanto estos inhibidores de la COX son capaces de disminuir la liberación de la PGE<sub>2</sub> y de reducir la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis del mediador, pero no modifican la expresión de los receptores de la prostaglandina.

El NO es otro de los mediadores implicados en la progresión de la OA y se ha involucrado en la destrucción del cartílago articular a través de diferentes mecanismos (Abramson SB, 2001; Blanco FJ, 1995; Pelletier JP, 2001a). En este sentido, el NO puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz del cartílago, tales como colágeno y proteoglicanos, aumentar la actividad de las MMP, incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reducir la síntesis del IL-1Ra, inhibir la proliferación e inducir apoptosis (López-Armada MJ, 2004). El líquido sinovial procedente de las articulaciones de pacientes con OA o AR posee altas concentraciones de NO (Farrell AJ, 1992) y se ha observado que el grado de lesión del cartílago está relacionado directamente con la cantidad de NO producido por el tejido artrósico (Hashimoto S, 1998). En modelos animales de OA, se ha observado que la inhibición de la síntesis del NO en los tejidos de la articulación retarda la degeneración del cartílago (Pelletier JP, 1998). Nuestros datos muestran que ni el ACF ni el CBX fueron capaces de disminuir de forma significativa la expresión o la síntesis de la iNOS en la membrana sinovial de pacientes artrósicos ni de modificar la concentración del NO en el líquido sinovial. Sin embargo, se ha observado que el condrocito es la principal fuente de NO en las articulaciones con OA (Amin AR, 1995), mientras que el tejido sinovial humano presenta una escasa capacidad para sintetizar y liberar NO (Rediske JJ, 1994). Estos datos parecen indicar que la membrana sinovial artrósica no constituye el tejido apropiado para estudiar el efecto de los AINE sobre la síntesis del NO en la OA. Las membranas sinoviales artrósicas son tejidos muy heterogéneos, que presentan una gran variabilidad en cuanto al contenido de macrófagos. Es muy probable que diferentes tipos celulares como macrófagos, sinoviocitos y condrocitos, todos ellos capaces de liberar mediadores inflamatorios al líquido sinovial, no respondan de la misma forma a los mismos estímulos. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación con la IL-1β no incrementaba la producción de NO en sinoviocitos en cultivo (Guicheux J, 2002). Por lo tanto, es posible que el descenso en los niveles de NO observado en el líquido sinovial de los pacientes tratados con el CBX sea debido al efecto del fármaco sobre los condrocitos o los macrófagos presentes en la articulación.

## **1.2 Efecto sobre la expresión de citoquinas.**

Todos los AINE parecen compartir ciertas similitudes en cuanto su capacidad de inhibir la síntesis de la PGE<sub>2</sub>. Sin embargo, hay muchas diferencias entre ellos en cuanto a otras acciones, como la inhibición de la síntesis de citoquinas, su toxicidad para los condrocitos normales o artrósicos, su efecto sobre la síntesis de la matriz del cartílago, etc. Nuestros estudios demostraron que la administración a largo plazo del CBX inhibía la expresión y síntesis de la IL-1β y del TNF-α en

la membrana sinovial de pacientes artrósicos en comparación a pacientes no tratados. Sin embargo, el tratamiento con el ACF no modificó de forma significativa estos parámetros.

Gracias a los estudios histopatológicos realizados en la membrana sinovial de los pacientes con OA de rodilla observamos la aparición de infiltrados leucocitarios en la capa íntima evaluados por la escala de Kreen (Kreen V, 2002), aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos CBX, ACF y CONTROL. A continuación analizamos la presencia de macrófagos en la membrana sinovial artrósica y observamos que aunque el patrón de distribución de los macrófagos fue similar en los pacientes tratados con el CBX y el ACF y en el grupo CONTROL, el CBX disminuyó significativamente la presencia de macrófagos en la capa íntima y en el intersticio de la membrana sinovial en comparación con el ACF

La concentración local de citoquinas proinflamatorias, principalmente de la IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$ , en el tejido sinovial inflamado es elevada durante la artrosis (Smith MD, 1997), y controla los mecanismos de degradación estructural de la articulación (Fernandes JC, 2002). Algunos autores han descrito que se produce un incremento en la síntesis de citoquinas paralelo a la disminución de los niveles de la PGE<sub>2</sub> durante los tratamientos con los AINE (Ferrari AJ, 1996; Schumacher HR, 1996; He W, 2002; Lopez-Armada MJ, 2002). Se ha especulado que este fenómeno se produciría por la supresión de los efectos protectores de la PGE<sub>2</sub> (Schucher HR, 1996; Lopez-Armada MJ, 2002). Los pacientes tratados con CBX y ACF presentaron diferencias en la expresión de citoquinas y en la densidad de macrófagos, aún teniendo niveles similares de la PGE<sub>2</sub> y de la COX-2. Estos datos sugieren que en la membrana sinovial de pacientes tratados con el CBX podría existir un mecanismo antiinflamatorio adicional independiente de la PGE<sub>2</sub> y la COX-2. Las citoquinas juegan un papel esencial en la inflamación sinovial crónica y son principalmente producidas por los macrófagos del tejido (Burger D, 2002). Se podría pensar que la depleción de macrófagos podría ser responsable, al menos en parte, del descenso en la síntesis de citoquinas que hemos visto en nuestro estudio. En este sentido, se ha demostrado que el CBX es un agente proapoptótico para varias estirpes celulares, incluyendo macrófagos humanos y fibroblastos sinoviales (Subhashini J, 2005; Kusunoki N, 2002). La hipótesis de que el efecto proapoptótico del CBX podría ser un mecanismo independiente de la COX se apoya en descubrimientos recientes que demuestran un efecto apoptótico del CBX en células que no expresan COX-2. Además, se ha demostrado que un fármaco derivado del CBX, que no es capaz de inhibir a la COX-2, actúa también como agente apoptótico (Grosch S, 2001; Song X, 2002; Waskewich C, 2002).

Además de disminuir la concentración de la PGE<sub>2</sub>, los inhibidores de la COX-2 podrían actuar a través de un nuevo mecanismo que está siendo discutido en la actualidad. En este sentido, estudios *in vivo* han demostrado que algunos AINE tienen propiedades antitumorales (Moore BC, 2000; Zha S, 2004). Esta propiedad podría ser debida, al menos en parte, a sus acción sobre otros procesos asociados, como por ejemplo el efecto antiangiogénico (Masferrer JL, 1999) o a los cambios que producen en la movilidad e invasividad celular que puede ser inducida tanto por inhibidores selectivos como por no selectivos de la COX-2 (Zha S, 2004). No se ha estudiado hasta el momento si el CBX o el ACF son capaces de modificar la angiogénesis en la membrana sinovial de pacientes artrósicos. De acuerdo con nuestros datos, estos tratamientos no fueron capaces de alterar el índice de sinovitis

global ni los cambios hipertróficos del intersticio, que incluyen la proliferación de vasos, evaluados por la escala de Kreen. Aunque esta escala fue diseñada para evaluar todo tipo de sinovitis, independientemente de su causa (Krenn V, 2002), es probable que carezca de la sensibilidad necesaria para realizar una medida específica de la angiogénesis en la membrana sinovial como característica relevante de daño en la misma.

### 1.3 Efecto sobre la expresión de las MMP.

Las MMP son una familia de endopeptidasas capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (Murphy G, 2002). Diferentes trabajos han demostrado la implicación de las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13 así como la estromelisin MMP-3 en la destrucción del cartílago articular que sucede en la OA (Billinghurst RC, 1997; Freemont AJ, 1997). En modelos animales se ha observado que la sobreexpresión de las MMP provoca una serie de alteraciones muy semejantes a las que acontecen durante el desarrollo de la OA humana (Neuhold LA, 2001). Varios autores han observado que la MMP-1, la MMP-3 y la MMP-13 se encuentran presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA, en unos niveles bastante elevados en el caso de la MMP-1 y la MMP-3 (Lohmander LS, 1993; Yoshihara Y, 2000). También se ha demostrado que la estimulación de fibroblastos sinoviales procedentes de pacientes artrósicos incrementa enormemente la expresión de la MMP-1 y la MMP-3 y en menor medida de la MMP-13 (Fuchs S, 2004). La expresión de la MMP por parte de la membrana sinovial influye en el desarrollo de la OA y parece ser que la degradación del cartílago articular se produce por la acción de metaloproteasas procedentes tanto de los condrocitos como de los sinoviocitos. En este sentido se ha demostrado que los fibroblastos sinoviales estimulados con citoquinas son capaces de degradar los componentes de la matriz del cartílago (Neidhart M, 2000). Nuestros datos demuestran que los tratamientos con el CBX y el ACF disminuyeron los niveles de la forma inactiva de la MMP-1 a la vez que incrementaba los de la forma activa de la metaloproteasa, sin embargo sólo se alcanzó la significación estadística en el caso del CBX. En cuanto a la MMP-3 ninguno de los dos fármacos modificó la síntesis de la enzima en la membrana sinovial de los pacientes artrósicos. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos *in vitro* en los que se ha observado que la depleción de la PGE<sub>2</sub> podría activar el catabolismo celular a través de la síntesis de las MMP (Pillinger MH, 2003; Dayer JM, 1976; He W, 2002).

La importancia de la sinovitis en la fisiopatología de la artrosis es una idea cada vez más reconocida (Pelletier JP, 2001b; Sharif M, 2000). Estudios recientes han demostrado que existe una fuerte asociación entre la progresión de la artrosis y la inflamación (Sharif M, 2000; Ayral X, 2005). Por tanto, la supresión de la inflamación podría reducir la progresión de la enfermedad. En esta parte de la tesis hemos demostrado que en pacientes con artrosis de rodilla, el tratamiento a largo plazo con los AINE CBX o ACF mejoró de forma similar el dolor y la función articular, disminuyó la concentración de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial, e indujo una disminución en la expresión y síntesis de la COX-2 y la mPGES-1 en la membrana sinovial. Los dos fármacos utilizados en el estudio, el CBX y el ACF parecen tener diferente perfil antiinflamatorio en cuanto al control de la infiltración de macrófagos y la expresión de citoquinas proinflamatorias en la membrana sinovial. Sin embargo hemos observado que aunque el tratamiento con los AINE disminuye la producción de la PGE<sub>2</sub>, inhibiendo por tanto una

de las principales vías implicadas en la inflamación que se observa en la OA, podría presentar efectos adversos al incrementar la activación de la MMP-1, una enzima muy implicada en la destrucción del cartílago articular.

## **2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE EL ESTADO CATABÓLICO DE CONDROCITOS Y SINOVIOCITOS EN CULTIVO.**

### **2.1 Efecto sobre la ruta de síntesis de los prostanoïdes y la del NO.**

La OA es una enfermedad degenerativa en cuyo desarrollo están implicadas todos los componentes de la articulación, incluyendo el cartílago articular y la membrana sinovial. Las células presentes en cada uno de estos tejidos, los condrocitos y los sinoviocitos, están implicadas en el inicio y desarrollo de la enfermedad que culmina en la degeneración de todas las estructuras que forman parte de la articulación. Aunque siempre se ha creído que el cartílago estaba más involucrado en el desarrollo de la OA, la implicación de la membrana sinovial en la progresión de la enfermedad ha aumentado en los últimos años. De hecho, los cambios patológicos que se observan en la membrana sinovial de pacientes con artrosis o artritis son bastante parecidos (Farahat MN, 1993) y existen numerosos trabajos que demuestran que los sinoviocitos juegan un papel fundamental tanto en el daño que se produce en la enfermedad como en la propagación de la inflamación (Mor A, 2005). Teniendo en cuenta todos estos trabajos es razonable pensar que tanto el condrocito como el sinoviocito pueden ser potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de la OA.

En ausencia de un tratamiento definitivo para la OA, los tratamientos que existen hoy en día se centran en reducir el dolor y mejorar la movilidad. A pesar del uso generalizado de los AINE en el tratamiento del dolor asociado a la OA, no parece que ninguno de estos fármacos sea capaz de ralentizar la progresión de la enfermedad (Fajardo M, 2005). Es más, en pacientes tratados con IND se ha observado una disminución del espacio articular en comparación al grupo placebo (Huskisson EC, 1995), por lo que a pesar de la implicación de la PGE<sub>2</sub> en la progresión de la inflamación asociada a la OA, el uso crónico de inhibidores de la ciclooxigenasa no parece atenuar la destrucción del cartílago articular que se observa en la enfermedad. En los últimos años se han empezado a utilizar en el tratamiento de la OA un grupo de fármacos conocidos como SYSADOA que incluye compuestos como la Glucosamina, el Condroitín sulfato o la Diacereína. Existen diferentes estudios *in vitro* que sugieren que la administración de los SYSADOA podría prevenir el daño del cartílago articular, aunque los resultados son contradictorios (Gouze JN, 2001; Shikhman AR, 2001; Largo R, 2003; Sanchez C, 2003; Verbruggen G, 2006). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios están realizados en cartílago o en condrocitos por lo que no se conoce muy bien el efecto que puedan ejercer estos fármacos sobre el metabolismo de los sinoviocitos.

Aunque los resultados obtenidos en los diferentes estudios *in vitro* son difíciles de trasladar a la enfermedad *in vivo*, estos estudios son de gran ayuda a la hora de analizar los efectos específicos de los fármacos sobre los mecanismos celulares implicados en la patogenía de una enfermedad concreta.



Los estudios *in vitro* son necesarios en la OA para tratar de discernir entre fármacos con efectos condroprotectores y aquellos que sólo son capaces de modificar los síntomas de la enfermedad.

La IL-1 $\beta$  es la principal citoquina liberada por condrocitos, sinoviocitos y los macrófagos que se encuentran en las articulaciones inflamadas. Esta citoquina juega un papel crítico en el proceso inflamatorio y en la destrucción del tejido conectivo que se observa en la OA (Sandell LJ, 2001). En nuestros experimentos, la estimulación con la IL-1 $\beta$  incrementó todos los parámetros catabólicos estudiados en los dos tipos celulares, excepto la liberación del NO por parte de los fibroblastos sinoviales. Existen diferentes estudios que demuestran que la mayor parte del NO liberado en el proceso inflamatorio asociado a la OA es producido por los condrocitos, y no se conoce muy bien el papel de los sinoviocitos en este proceso. En nuestras condiciones experimentales, los sinoviocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  producían unos niveles extremadamente bajos o incluso indetectables de NO, resultados que están de acuerdo con publicaciones previas (Guicheux J, 2002).

Nuestros resultados muestran que los compuestos de glucosamina SG y HG fueron capaces de controlar los mediadores proinflamatorios estudiados tanto en condrocitos como en sinoviocitos. Estos fármacos disminuyeron los niveles proteicos de la COX-2 así como la liberación de la PGE<sub>2</sub> y el NO al sobrenadante celular después de la estimulación de los dos tipos celulares con la IL-1 $\beta$ . Es más, la estimulación de condrocitos humanos con la IL-1 $\beta$  daba lugar a un incremento en la liberación de la PGE<sub>2</sub> que se inhibió en presencia del SG tanto a las 6 como a las 24 horas de incubación con el fármaco. En cuanto a la COX-2, la preincubación de los condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  con el SG provocó una disminución de los niveles proteicos de la enzima, así como una reducción en la expresión génica de la COX-2, mientras que no modificó los niveles de la isoforma constitutiva COX-1. Sin embargo, el efecto observado con AcG no fue completo, ya que mientras fue capaz de reducir la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en los dos tipos celulares y la síntesis de la COX-2 en sinoviocitos, no pudo revertir el incremento en los niveles de NO y de la COX-2 debido a la estimulación de los condrocitos con la IL-1 $\beta$ . En un trabajo previo se había observado que AcG disminuía la expresión y síntesis de la iNOS y la COX-2 y la liberación de NO en condrocitos humanos estimulados con IL-1 $\beta$  (Shikhman AR, 2001). Las diferencias observadas en los resultados podrían deberse a que las dosis utilizadas en estos experimentos (10 mM) son bastante más elevadas que las hemos empleado nosotros. Es más, a la concentración utilizada en nuestro estudio (2 mM), casi no es apreciable la disminución en la síntesis de NO observada en este trabajo (Shikhman AR, 2001). Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos con los tres compuestos de glucosamina utilizados pueden deberse a diferencias en la composición de los fármacos. El SG y el HG son preparaciones en forma cristalina en las que la glucosamina y el grupo sulfato o el hidrocloreuro son dos moléculas independientes, por lo que cuando se utilizan estos compuestos se acepta que el monosacárido es el ingrediente activo de la preparación y, por tanto, es razonable que los resultados obtenidos con los dos compuestos sean similares. Sin embargo, el derivado acetilado AcG, actúa sobre el metabolismo celular sin que se produzca la deacetilación del compuesto, por lo que parece razonable pensar que este fármaco module de forma diferente los mediadores estructurales e inflamatorios estudiados.

Entre los otros SYSADOA empleados en los estudios *in vitro*, la DC redujo la liberación del NO al sobrenadante celular de los condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$ . La DC disminuye la inflamación que

se observa en diferentes modelos experimentales de daño articular (Moore AR, 1998) lo cual podría ser debido a su capacidad para inhibir la síntesis del NO. Sin embargo, la DC no modificó el aumento en los niveles proteicos de la COX-2 ni en la liberación de la PGE<sub>2</sub> inducido por la citoquina e incluso provocó un incremento en la síntesis de estos mediadores en sinoviocitos. De hecho, trabajos previos han demostrado que la DC aumenta la síntesis de prostaglandinas tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en Verbruggen G, 2006), lo cual podría explicar el bajo control que ejerce este fármaco sobre la sintomatología asociada a la OA en los ensayos clínicos realizados (Dougados M, 2001). Este mecanismo de acción de la DC por el cual es capaz de aumentar la expresión de la COX-2 y la producción de la PGE<sub>2</sub>, independientemente de su capacidad para inhibir la síntesis de NO es similar al de las tetraciclinas, que son capaces de inhibir a la iNOS a la vez que aumentan la expresión de la COX-2 (Attur MG, 1999).

Nuestros datos muestran que el C-6S no modificó significativamente la activación de las células inducida por la IL-1 $\beta$ . Estos resultados no coinciden con estudios previos que demostraban una disminución en la expresión de la COX-2 y en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en células tratadas con condroitín sulfato (Chan PS, 2005). Las diferencias entre los datos podrían ser debidas al uso de diferentes compuestos a la hora de realizar los experimentos (condroitín polisulfato, glicosaminglicanos sulfatados, C-6S, C-4S y C-4-6S). El Condrotín sulfato engloba a un grupo heterogéneo de compuestos que presentan diferente peso molecular y densidad de cargas. Además estas variantes de CS parece que se distribuyen diferencialmente en los distintos tejidos y en diferentes dominios funcionales dentro de cada tejido. Estos datos sugieren que los diversos tipos de CS, que presentan un grado y patrón de sulfatación diferente, podrían tener funciones distintas dentro de un mismo organismo (Sorrell JM, 1990). Finalmente, hay que tener en cuenta que aunque el CS se obtiene generalmente a partir de traquea bovina, cada compañía farmacéutica puede procesar de forma diferente el compuesto, de forma que varía la pureza del CS obtenido finalmente en lo que se refiere a peso molecular, patrón de sulfatación y cantidad de otros GAG (como queratan sulfato, dermatan sulfato, etc.) presentes en la preparación. Estas diferencias también pueden modificar los resultados terapéuticos que se obtienen tras la administración del fármaco (Kelly GS, 1998). Por lo tanto a la hora de comparar los resultados obtenidos en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, es necesario considerar el tipo de compuesto utilizado, ya que las diferencias en los resultados podrían deberse a diferencias en la composición del CS empleado en cada sistema experimental.

Existen varios trabajos en los que se ha investigado el posible papel de los antioxidantes como candidatos en el tratamiento de las enfermedades articulares inflamatorias. Recientemente se ha demostrado que la NAC inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación del NF $\kappa$ B en estudios *in vivo* (Zafarullah M, 2003) e incrementa los efectos supresores de los AINE en la producción de PG en monocitos (Hoffer E, 2002). Nuestros experimentos muestran que la NAC no disminuyó la liberación de NO en condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$ . Los trabajos previos existentes en la literatura apuntan a que este compuesto es capaz de incrementar la expresión y síntesis de la iNOS así como la liberación de NO en células vasculares (Jiang B, 1999) y en condrocitos (Mathy-Hartert M, 2002; Sasaki K, 1998), lo cual parece deberse a que NAC modula el estado de oxidación/reducción intracelular de forma que produce un microambiente más reductor que podría influenciar en las rutas de

señalización sensibles al estado redox de las células. La NAC bloquea la reacción por la cual el anión superóxido reacciona con el NO para generar peroxinitritos, con lo que es capaz de aumentar las concentraciones intracelulares del mediador. En cuanto a las prostaglandinas, la NAC tuvo unos efectos completamente diferentes dependiendo del tipo celular sobre el que actuara. Mientras que este fármaco no fue capaz de regular el metabolismo condrocitario, en sinoviocitos la NAC inhibió la síntesis de la COX-2 y la liberación de la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1 $\beta$ . Los datos previos existentes en la literatura muestran que los efectos de la NAC sobre la COX-2 y la PGE<sub>2</sub> dependen bastante de las condiciones experimentales y del tipo celular empleado, de forma que este fármaco es capaz tanto de inhibir la ruta de síntesis de las prostaglandinas en osteoblastos (Origuchi T, 2000) como de no modificarla en condrocitos humanos (Mathy-Hartert M, 2002).

Los glucocorticoides se usan habitualmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en parte debido a su capacidad para inhibir la expresión y función de citoquinas. Está totalmente establecido que estos fármacos modifican los medidores inflamatorios implicados en las enfermedades articulares, de forma que son capaces de inhibir la producción de NO así como la expresión y síntesis de la iNOS y la COX-2 en diferentes tipos celulares (revisado en Czock D, 2005). En nuestros experimentos incluimos la MP, un fármaco de la familia de los glucocorticoides, como control positivo de nuestro estudio, y observamos que este compuesto disminuía el incremento en la síntesis de la COX-2 y en la liberación de la PGE<sub>2</sub> y el NO inducido por la IL-1 $\beta$  tanto en condrocitos como en sinoviocitos.

En cuanto a los AINE (CBX, DCF, MXC e IND) utilizados en los experimentos *in vitro*, los resultados que obtuvimos fueron bastante uniformes. Todos fueron capaces de disminuir, en muchos casos incluso por debajo de los niveles encontrados en células no estimuladas con la IL-1 $\beta$ , la liberación de la PGE<sub>2</sub> al sobrenadante celular tanto de condrocitos como de sinoviocitos y sorprendentemente inhibieron la síntesis de la COX-2 en los dos tipos celulares. En los últimos años se ha estudiado en profundidad el mecanismo de acción de estos fármacos. La capacidad de estos fármacos para inhibir la síntesis de la COX-2 y la liberación de la PGE<sub>2</sub> tras la estimulación con citoquinas se había descrito en células leucémicas anteriormente (Takada Y, 2004). En cuanto a células de la articulación, se han realizado varios estudios *in vitro* (Kojima F, 2004; Hardy MM, 2002). En concreto, se ha demostrado que la utilización de inhibidores selectivos de la COX-2 disminuye la liberación de la PGE<sub>2</sub> en explantes de cartílago y membrana sinovial (Hardy MM, 2002). Nuestros resultados demuestran que tanto en condrocitos como en sinoviocitos, la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> provoca un efecto directo sobre la expresión génica y la presencia proteica de la COX-2. Estos resultados coinciden con lo observado en los estudios *in vivo* en la membrana sinovial de pacientes artrósicos y aunque no se conoce el mecanismo responsable de estos efectos, podrían estar implicados mecanismos tanto dependientes como independientes de PGE<sub>2</sub> (Alvarez-Soria MA, 2006; Faour WH, 2001).

Cada vez existen más pruebas que apoyan la idea de que los diferentes y a la vez específicos efectos de la PGE<sub>2</sub> dependen de la expresión en la superficie celular de los diferentes subtipos de receptores EP (Breyer RM, 2001). Dependiendo del subtipo de receptor que se active, la respuesta celular en cuanto a la producción de mediadores inflamatorios versus moléculas anabólicas podría variar (Guan Y, 1998). Este podría ser el motivo que explicara los efectos diferentes, e incluso opuestos, de la PGE<sub>2</sub> en el cartílago dependiendo del sistema experimental utilizado (Breyer RM,

2001; Largo R, 2004). En trabajos anteriores nuestro grupo demostró que la IL-1 $\beta$  aumentaba la expresión de los receptores EP en células sinoviales (Largo R, 2004). En relación al cartílago, muchos estudios han señalado que la PGE<sub>2</sub> en condrocitos en cultivo disminuye la síntesis de proteoglicanos e incrementa la producción de metaloproteasas, así como también modula alguna de las acciones de la IL-1 $\beta$  en el cartílago (Noguchi K, 2002). Por otro lado, se han descrito efectos anabólicos interesantes, al menos en condrocitos de la zona sin carga, para la PGE<sub>2</sub>, en cuanto a la estimulación de la proliferación, la acumulación de proteoglicanos y la inducción del ARNm del colágeno tipo II (Yamane H, 2000). Estos procesos tienen lugar en respuesta a la estimulación simultánea de EP-2 y EP-4. Sin embargo, el receptor EP-1 media diferentes respuestas celulares inducidas por la PGE<sub>2</sub> que conducen a una disminución en la proliferación y a un aumento en la diferenciación en condrocitos de la zona de crecimiento (Fehrenbacher JC, 2005; Spaziani EP, 1998). Existen trabajos recientes que demuestran que la liberación de calpaina inducida por el TNF- $\alpha$  en células HCS-2/8 de condrosarcoma está mediada principalmente por el receptor EP-2 (De Brum-Fernandes AJ, 1996), pero, en general, existe poca información sobre la regulación de los diferentes subtipos de receptores EP en condrocitos en respuesta a la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , los dos principales mediadores proinflamatorios en las articulaciones afectadas.

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* demuestran que la presencia de la IL-1 $\beta$  estimula la expresión génica de EP-1 y EP-4 en condrocitos. Esta inducción parece ser independiente de PG ya que no se modificó en presencia de los AINE, lo cual coincide con los resultados obtenidos *in vivo*, ya que ninguno de los dos AINE utilizados para el tratamiento de pacientes artrósicos fue capaz de disminuir la expresión de los receptores EP estudiados. Por lo tanto, la IL-1 $\beta$  podría ejercer una doble acción sobre el sistema de las PG, incrementando tanto la producción de la PGE<sub>2</sub> como la sensibilidad de los condrocitos al eicosanoide mediante la inducción de sus receptores. El mensaje transmitido después de la activación de los receptores EP-1 o EP-4 podría depender en gran medida del estado metabólico de las células.

En cuanto al otro mediador proinflamatorio estudiado, ninguno de los AINE (CBX, DCF, MXC e IND) utilizados en los experimentos *in vitro* fue capaz de disminuir la liberación del NO inducida por la IL-1 $\beta$  al sobrenadante celular de los condrocitos, lo que coincide con la literatura previa (Matsuda K, 2006; Attur MG, 1998). No obstante, en algunos trabajos se había observado una disminución de los niveles de NO en condrocitos con inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 como el CBX (Matsuda K, 2006). Sin embargo este efecto se observa a una dosis 10 veces superior a la empleada en nuestros experimentos *in vitro*, con lo que es posible que a dosis fisiológicas no se observe una disminución de los niveles de la PGE<sub>2</sub> tras el tratamiento con los inhibidores de la ciclooxigenasa.

Actualmente está demostrado que la inflamación juega un papel fundamental en la progresión de la OA y que la acción de las diferentes citoquinas inflamatorias parece estar regulada por dos mediadores fundamentalmente, el NO y la PGE<sub>2</sub> (Berenbaum F, 2004; Haywood L, 2003). Sin embargo en diferentes trabajos se ha observado que estos mediadores presentan tanto efectos pro como antiinflamatorios (Henrotin YE, 2003; Guilak F, 2004). Además, hay que tener en cuenta que existe una compleja interrelación entre las vías NOS y COX. En este sentido se ha observado que los prostanoideos son capaces de disminuir la expresión de la iNOS y la producción del NO, y que dicha modulación a su

vez puede influir en la síntesis de las PG a través de la modulación de la transcripción génica de los genes que codifican para la ciclooxigenasa así como la modulación de la actividad enzimática de la COX (Guilak F, 2004). Por lo tanto, el balance entre los mediadores NO y PGE<sub>2</sub> que determina la homeostasis normal en los tejidos es complejo y crea un dilema en lo que se refiere al tratamiento farmacológico. En un contexto patológico, como la OA, tanto la iNOS como la COX-2 se encuentran activadas, por lo que aquellas terapias que sean capaces de controlar ambas vías podrían tener efectos beneficiosos en el control de los mecanismos patológicos asociados a la enfermedad. Sin embargo, debido a que ambos mediadores presentan también efectos antiinflamatorios, la depleción total de los niveles de alguno de ellos podría tener efectos negativos en la progresión de la enfermedad.

## 2.2 Efecto sobre la síntesis de MMP.

La degradación progresiva de la matriz extracelular de los tejidos que forman parte de la articulación es una de las principales características de la OA. Las principales enzimas implicadas en este proceso son las MMP, capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular. Dentro de las MMP, la colagenasa 1 (MMP-1) y la colagenasa 3 (MMP-13) están muy implicadas en la degradación del colágeno II que se observa en el cartílago articular en la OA (Billinghurst RC, 1997). MMP-1 es sintetizada tanto por condrocitos como por sinoviocitos, mientras que MMP-13 es sintetizada sobre todo por condrocitos, por lo que algunos autores piensan que la MMP-1 es la principal colagenasa implicada en la AR, donde se produce la proliferación de la membrana sinovial hasta formar un pannus, mientras que la MMP-13 estaría más implicada en el desarrollo de la OA donde el condrocito juega un papel más importante en la destrucción del cartílago articular (Murphy G, 2002). Sin embargo, diferentes trabajos muestran que los niveles de la MMP-13 se encuentran incrementados en fibroblastos sinoviales procedentes de pacientes artrósicos (Walling HW, 2003). Así mismo, se ha observado que la estimulación con la IL-1 $\beta$  induce en sinoviocitos un incremento en la síntesis de la MMP-13, aunque dicho incremento es mucho menor que el observado en condrocitos (Guicheux J, 2002; Fuchs S, 2004). Todos estos datos apuntan a que las MMP que degradan el cartílago articular en la OA proceden tanto del propio cartílago como de la membrana sinovial.

Nuestros datos procedentes de los experimentos *in vitro* muestran que la estimulación con la IL-1 $\beta$  tanto de condrocitos como de sinoviocitos incrementó la síntesis de las dos colagenasas estudiadas en este trabajo, MMP-1 y MMP-13. Sin embargo, el incremento en la síntesis de estas colagenasas fue mucho mayor en condrocitos en comparación a sinoviocitos. Además, en comparación a la MMP-1, los niveles de la MMP-13 liberados al sobrenadante celular de ambos tipos celulares son bastante bajos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad catalítica de la MMP-13 para degradar el colágeno tipo II es diez veces superior a la de la MMP-1 (Mitchell PG, 1996), lo que sugiere que aún siendo menor la síntesis de la MMP-13 esta enzima juega un papel fundamental en la degradación del cartílago articular que se observa en la OA.

En cuanto a la producción de las MMP, el SG fue capaz de disminuir los niveles de la MMP-1 y la MMP-13 en los dos tipos celulares. El AcG y el HG disminuyeron la síntesis de las colagenasas en sinoviocitos, pero no modificaron los niveles de las enzimas en condrocitos. Actualmente se desconoce si estas diferencias observadas en los estudios *in vitro* pueden estar relacionadas con el posible efecto

de los agentes modificadores de la estructura en el cartílago artrósico (Richy F, 2003; Reginster JY, 2001; Pavelka K, 2002).

La DC no modificó la síntesis de las MMP en condrocitos, aunque consiguió disminuir el incremento en los niveles de la MMP-13 inducidos por la estimulación con la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos. Los resultados obtenidos por otros autores muestran que la reina, el metabolito activo de la DC, disminuye la síntesis de varias MMP, entre las que se encuentran la MMP-1 y la MMP-13 en condrocitos de conejo (Tamura T, 2001). Sin embargo, a la concentración empleada en nuestros experimentos (10  $\mu$ M) este compuesto solo controla parcialmente la expresión de las metaloproteasas, siendo necesarias concentraciones mayores para revertir totalmente el aumento en la expresión de las MMP inducido por la estimulación con la IL-1 $\beta$ . A pesar de las discrepancias, estos resultados podrían explicar en parte los efectos como agente modificador de la estructura que se atribuyen a la DC en diferentes ensayos clínicos realizados con pacientes artrósicos (Dougados M, 2001; Richy F, 2003; Reginster JY, 2001; Pavelka K, 2002; Tiraloché G, 2005; Shikhman AR, 2005).

El C-6S inhibió la síntesis de la MMP-1 en condrocitos y la de MMP-13 en sinoviocitos, pero incrementó los niveles de la MMP-13 en condrocitos. Existe mucha controversia en los datos previos existentes en la literatura en lo que se refiere al control de las MMP por parte del condroitín sulfato. En este sentido se ha observado que un tipo de condroitín polisulfatado es capaz de reducir la actividad colagenasa total de las células y de inhibir la expresión de la MMP-1 y la MMP-3 en condrocitos articulares (Sadowski T, 2002). Sin embargo, también se ha descrito que el C-6S incrementa la activación de las MMP en explantes corneales (Isnard N, 2003). Igual que pasaba con los mediadores proinflamatorios. Las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos por los diferentes grupos podrían ser debidas al uso de diferentes tipos de condroitín sulfato.

La NAC también aumentó los niveles de la MMP-13 en condrocitos, mientras que en sinoviocitos produjo el efecto contrario disminuyendo los niveles de la colagenasa. En cuanto a la MMP-1, la NAC no modificó el incremento en la síntesis inducido por la IL-1 $\beta$  en ninguno de los dos tipos celulares. A pesar de nuestros resultados, es posible que la NAC ejerza algún control sobre las MMP ya que existen trabajos previos en la literatura que demuestran que este fármaco es capaz de inhibir la expresión génica de las colagenasas tanto en fibroblastos sinoviales como en condrocitos (Zafarullah M, 2003), aunque las dosis requeridas para inhibir la expresión de las MMP en estos estudios fueron mayores que las utilizadas en nuestros experimentos.

La MP, el glucocorticoide incluido en el estudio como control positivo, disminuyó de forma significativa los niveles de la MMP-1 y la MMP-13 tanto en condrocitos como en sinoviocitos, como era esperable, ya que trabajos previos han demostrado que los glucocorticoides, incluso a dosis bajas, son inhibidores muy potentes de la síntesis de las MMP (Sadowski T, 2001).

En cuanto a los AINE (CBX, DCF, MXC e IND), estos fármacos incrementaron de forma significativa los niveles de la MMP-1 en el sobrenadante celular de los dos tipos celulares y los niveles de la MMP-13 en condrocitos. En cuanto a la síntesis de la MMP-13 en sinoviocitos, ninguno de los AINE clásicos fue capaz de modificar la síntesis de esta enzima. Sin embargo, el CBX provocó un incremento en la síntesis de la colagenasa por enzima de los niveles alcanzados con la estimulación con la IL-1 $\beta$ . A pesar del uso generalizado de los AINE en el tratamiento de la OA, no existen pruebas

de que estos fármacos sean capaces de atenuar la destrucción del cartílago articular. Es más, el tratamiento de pacientes artrósicos con IND parece provocar una disminución del espacio articular en comparación a pacientes control (Huskisson EC, 1995). En experimentos realizados en explantes de cartílago humano normal o artrósico se ha observado que ciertos AINE utilizados a dosis fisiológicas inhiben la síntesis de glicosaminoglicanos (McKenzie LS, 1976). Diferentes grupos han demostrado que las diferentes PGE son capaces de disminuir la expresión de la MMP-1 y la MMP-13 en diferentes tipos celulares estimulados con citoquinas (Pillinger MH, 2003; Abramson SB, 2004; Noguchi K, 2005; Di Battista JA, 1994). Estudios *in vitro* previos han demostrado que los inhibidores de la COX presentan un efecto negativo sobre la expresión de las colagenasas. En este sentido, se ha observado que la IND estimula la producción de colagenasas en células sinoviales (Dayer JM, 1976) y que un inhibidor selectivo de la COX-2, como es el NS-398 induce la síntesis de la MMP-1 en explantes sinoviales de pacientes con OA (He W, 2002). La IND y el NS-398 también incrementan la expresión de la MMP-13 en células humanas estimuladas con citoquinas (Noguchi K, 2005). Finalmente, se ha demostrado que la PGE<sub>1</sub> y la PGE<sub>2</sub> inhiben en fibroblastos sinoviales en cultivo la expresión de la MMP-1 a través de la inhibición de la quinasa ERK. En cambio, diferentes inhibidores de la COX, tanto selectivos como no selectivos (IND, ibuprofeno, CBX, NS-398, etc.) incrementan la producción de la MMP-1 debido a la depleción de la PGE<sub>1</sub> y la PGE<sub>2</sub> y por consecuencia del incremento en la activación de ERK (Pillinger MH, 2003; Abramson SB, 2004). Estos resultados parecen confirmar estudios previos realizados en un modelo experimental de OA en el cual se observaba que la administración oral de un inhibidor selectivo de la MAP quinasa quinasa (MEK) tiene como resultado la inhibición de ERK y la reducción de la inflamación sinovial, así como la disminución en la expresión de la MMP-1 y la progresión del daño estructural asociado a la enfermedad (Pelletier JP, 2003). Por lo tanto, los datos obtenidos en los experimentos *in vitro* coinciden con lo observado en los estudios *in vivo* y podrían ser una posible explicación de por qué aunque los AINE son capaces de disminuir las inflamación asociada a la OA, no son capaces de retardar la destrucción del cartílago articular (Huskisson EC, 1995).

La PGE<sub>2</sub> es un mediador dual, por un lado favorece la progresión de la enfermedad al incrementar la degradación de los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular de los tejidos de la articulación (Hardy MM, 2002). Sin embargo la presencia de este mediador disminuye la expresión y síntesis de diferentes citoquinas (Guilak F, 2004). Todos estos resultados podrían indicar que tanto niveles excesivos como niveles subfisiológicos de PGE<sub>2</sub> pueden ser perjudiciales, una hipótesis que ya han apuntado diferentes grupos de investigación (Largo R, 2004; Guilak F, 2004; Noguchi K, 1999; Takahashi HK, 2002).

En los experimentos *in vitro* realizados con diferentes dosis del SG observamos que este fármaco era capaz de controlar los diferentes parámetros estudiados en el rango de concentración 0.2-2 mM. Por lo que en el resto de los experimentos comparamos los efectos de los SYSADOA a una concentración de 2 mM. En cuanto al resto de los fármacos, utilizamos unas concentraciones de AINE, DC y MP cercanas a la concentración media plasmática obtenida tras la administración oral de una dosis terapéutica (Sanchez C, 2002; Nicolas P, 1998; Czock D, 2005;). Estudios farmacocinéticos recientes muestran que tras la administración de una dosis terapéutica del SG se alcanza una concentración en suero y líquido sinovial de 10 µM (Persiani S 2005a; Persiani S, 2005b). Sin embargo

en el cartílago y el tejido sinovial parece que se produce la acumulación de glucosamina (Piperno M, 2000; Setnikar I, 2001; Dodge GR, 2001; Giraud I, 2000), por lo que la continua administración de este fármaco a los pacientes con OA podría aumentar la concentración local de este compuesto en estos tejidos. Además parece que la administración a largo plazo del SG podría aumentar la concentración de glucosamina (Biggee BA, 2006), lo cual podría explicar la respuesta retardada que se observa en los ensayos clínicos realizados con glucosamina en comparación a los realizados con AINE. Biggee y colaboradores realizaron estudios farmacocinéticos en los cuales se administraba una única dosis oral de SG. En estos estudios se ha observado diferencias en los niveles de glucosamina en plasma en aquellos individuos que previamente habían tomado el fármaco. Estos pacientes presentaban una respuesta más rápida, de modo que aparecían niveles detectables de glucosamina en plasma y se alcanzaban los niveles máximos en un tiempo menor en comparación a los pacientes que nunca habían tomado el fármaco anteriormente. Además los niveles máximos de glucosamina en plasma alcanzados también eran superiores en los individuos previamente tratados con el fármaco (Biggee BA, 2006). Finalmente en diferentes estudios *in vitro* se han descrito efectos antiinflamatorios e inhibidores de la colagenasa con dosis de 5-300  $\mu\text{M}$  de glucosamina, dosis cercanas a la concentración media plasmática que se observa tras la administración de una dosis terapéutica del fármaco (Dodge GR, 2003; Piperno M, 2000; Chan PS, 2005).

Con todos estos resultados y teniendo en cuenta que la extrapolación de los datos *in vitro* a *in vivo* es complicada, nuestro trabajo solo trata de sugerir alguna de los posibles mecanismos a través de los cuales los compuestos de glucosamina pueden afectar al metabolismo del cartílago y la membrana sinovial en la OA.

En conclusión, este es el primer estudio en el cual se ha comparado el efecto de los principales fármacos empleados en el tratamiento de la OA en lo que se refiere al control de las rutas inflamatorias y estructurales en dos tipos celulares implicados en el desarrollo de la OA. La glucosamina es capaz de inhibir la síntesis de estos mediadores en condrocitos y sinoviocitos artrósicos estimulados con la IL-1 $\beta$ . Otros fármacos que se engloban en el grupo de los denominados SYSADOA solo controlan parcialmente alguno de los mecanismos estudiados. Los AINE inhibieron las rutas de la ciclooxigenasa, disminuyendo la liberación de la PGE<sub>2</sub> hasta niveles prácticamente indetectables, pero los fármacos incluidos en este grupo no consiguieron controlar, o incluso aumentaron, la presencia de las proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Nuestros datos apoyan la idea de que la glucosamina no sólo inhibe los mediadores que controlan el dolor y la inflamación sino que también interfiere con las rutas que son directamente responsables de la destrucción del cartílago articular en la OA.

### **3. IMPLICACIÓN Y MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL NF $\kappa$ B EN LA EXPRESIÓN DE LOS MEDIADORES PROINFLAMATORIOS Y ESTRUCTURALES CARACTERÍSTICOS DE LA OA.**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en la transmisión de señales desde el citoplasma al núcleo en diversos tipos celulares. El NF $\kappa$ B se localiza en la membrana sinovial y el



cartílago de tejidos artríticos y artrósicos, siendo esencial en la iniciación y perpetuación de la sinovitis crónica, en la hiperplasia de la membrana sinovial y en la respuesta del cartílago articular a la sobrecarga (Firestein GS, 1999). La participación del NFκB en las enfermedades articulares inflamatorias se ha demostrado en diferentes modelos animales en los que se ha observado que la activación del factor nuclear se produce en los estadios iniciales de la enfermedad y que la inhibición de dicha activación disminuye la producción de mediadores proinflamatorios y la gravedad de las lesiones observadas (Han Z, 1998; Tsao PW, 1997; Tak PP, 2001). El NFκB está implicado en la expresión de metaloproteasas (MMP-1, MMP-3 y MMP-13), y de enzimas como la COX-2 y la iNOS, muy implicadas en la patología de las enfermedades articulares (Berenbaum F, 2004). Por lo tanto, quisimos estudiar la implicación y modulación farmacológica de NFκB en la expresión de los mediadores proinflamatorios y estructurales estudiados en los apartados anteriores de la tesis.

Diferentes estímulos, entre los que se encuentra la IL-1β, inducen la activación de este factor en condrocitos y en sinoviocitos (Clancy R, 2004; Gomez PF, 2005). En los estudios *in vitro* observamos que la estimulación con la citoquina provocó una activación tiempo dependiente del NFκB observándose la máxima respuesta a los 60 minutos. En nuestros experimentos observamos que la DC fue capaz de inhibir la activación del NFκB en los dos tipos celulares. La DC disminuye la gravedad de las lesiones observadas en la OA, tanto en tejidos humanos (Nguyen M, 1994) como en diferentes modelos experimentales de daño articular (Smith GN, 1999; Moore AR, 1998), un efecto que podría ser debido a su capacidad para inhibir la activación del NFκB. El C-6S solo fue capaz de disminuir la activación del NFκB inducida por la estimulación con la IL-1β en sinoviocitos no siendo capaz de modificar la activación del factor nuclear en condrocitos. La NAC volvió a producir un efecto dependiente del tipo celular, de forma que mientras no fue capaz de regular la activación del NFκB en condrocitos, en sinoviocitos disminuyó la activación del factor nuclear debida a la estimulación con la IL-1β. Recientemente se ha demostrado que la NAC inhibe la producción la activación del NFκB en estudios *in vivo* (Zafarullah M, 2003). Existen datos previos en la literatura que apoyan los resultados obtenidos, ya que en diferentes estudios se ha observado que la NAC disminuye la activación del NFκB en diferentes tipos celulares (macrófagos, células mesangiales, astrositos) (Pahan K, 1998; Khachigian LM, 1997), mientras que en otros estudios, el tratamiento con la NAC no modificó la activación del factor nuclear inducida por la estimulación con diferentes citoquinas (Brennan P, 1995; Jiang B, 1999). Los efectos de la NAC sobre el metabolismo celular podrían deberse a su capacidad de inhibir otras rutas de transducción de señales intracelulares. En este sentido se ha observado que este fármaco incrementa la activación de las p44/42 MAPK en células vasculares estimuladas con la IL-1β. Estas enzimas que se han visto implicadas en la expresión de la iNOS, por lo que parece razonable pensar que laNAC provoque un incremento en la expresión de la iNOS (Jiang B, 2000).

En cuanto al resto de los fármacos, la MP disminuyó la activación del NFκB tanto en condrocitos como en sinoviocitos, como ya se había observado previamente en la literatura (Czock D, 2005). En lo que se refiere a los inhibidores de la COX todos los AINE (CBX, DCF, MXC e IND), excepto la IND en sinoviocitos, fueron capaces de revertir el incremento en la activación del NFκB inducido por la estimulación con la IL-1β. Existen datos previos en la literatura que demuestran que diferentes AINE son capaces de inhibir la activación del NFκB. El ácido acetil salicílico es capaz de inhibir a la IκB quinasa,

impidiendo la translocación al núcleo de los dímeros del factor nuclear (Cavallini L, 2001). Otros inhibidores de la COX como el ibuprofeno o el CBX incrementan la translocación al núcleo de p65 mientras que inhiben la de la subunidad p50 en fibroblastos sinoviales (Gomez PF, 2005). Estos autores demuestran que este efecto se debe a la depleción de la PGE<sub>2</sub> que se produce como consecuencia del tratamiento con los fármacos, ya que la adición de PGE<sub>2</sub> exógena inhibe la translocación al núcleo de p65 en células estimuladas, mientras que promueve la acumulación en el núcleo de p50 (Gomez PF, 2005). Estos resultados son muy interesantes ya que datos previos de la literatura muestran que mientras que la translocación al núcleo de los dímeros p50/p65 induce la transcripción de numerosos genes implicados en procesos inflamatorios, los homodímeros p50/p50 se unen a los sitios de unión para NFκB presentes en el ADN, pero no son capaces de inducir la expresión génica (Udalova IA, 2000; Plaksin D, 1993).

En cuanto a los resultados obtenidos con los compuestos de glucosamina, observamos que el SG y el HG disminuyeron la activación del NFκB, después de la estimulación de las células con la IL-1β, lo cual podría explicar en parte la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> y el NO, así como de expresión de la COX-2 y de las MMP estudiadas, que se observa tras el tratamiento con el SG y el HG. El otro compuesto de glucosamina utilizado en los experimentos *in vitro*, el AcG, no pudo revertir la activación del NFκB, como ya se había descrito en trabajos anteriores (Shikhman AR, 2001). Además en los experimentos *in vitro* observamos que mientras que el SG prevenía la activación del NFκB en células estimuladas no tenía ningún efecto sobre la activación de otros factores nucleares como AP-1. Además, hemos observado que el heterodímero p50-p65 es el componente mayoritario que participa en la activación del NFκB en condrocitos humanos estimulados con la IL-1β. En este estudio también se describe el efecto del SG sobre la translocación al núcleo de las subunidades del NFκB. La preincubación con el SG previno la degradación de la subunidad inhibitoria IκBα y la traslocación al núcleo tanto de p50 como de p65 inducida por la IL-1β en condrocitos humanos.

Nuestros datos apoyan firmemente la hipótesis de que la inhibición de la activación del NFκB inducida por el SG podría ser la responsable de la disminución de la expresión y síntesis de la COX-2 y la iNOS y por tanto, de la liberación de la PGE<sub>2</sub> y el NO al medio extracelular. Diferentes trabajos han demostrado que el NFκB está también implicado en la regulación de las diferentes isoenzimas de la PLA<sub>2</sub> (Roshak A, 1997; Lappas M, 2004) y que el SG en condrocitos artrósicos es capaz de disminuir la actividad de la PLA<sub>2</sub>, otra proteína muy implicada en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> (Piperno M, 2000). El SG podría disminuir la inflamación asociada a la OA mediante el control de las funciones de los neutrófilos y leucocitos (expresión de moléculas de adhesión, fosforilación de las proteínas p38 o la quimiotaxis), la inhibición de la actividad inmune y la inhibición en la expresión de genes NFκB-dependientes (Hua J, 2002; Chen JT, 2006; Ma L, 2002). Además la glucosamina es capaz de inhibir la agregación plaquetaria, la liberación de ATP y la producción de tromboxano A<sub>2</sub> tanto *in vivo* como *in vitro* (Lu-Suguro JF, 2005; Hua J, 2004). Por tanto, la inhibición del factor NFκB podría ser la responsable, al menos en parte, de los efectos beneficiosos que se han descrito para este fármaco en condiciones de inflamación articular. Además de las propiedades antiinflamatorias descritas, otros mecanismos adicionales podrían ser los responsables del efecto específico del SG sobre la articulación, debido al efecto del fármaco sobre la degradación de glicosaminoglicanos. La

recuperación del balance homeostático entre degradación y síntesis en el cartílago articular podría tener beneficios estructurales que se reflejaran en una mejora en los signos radiológicos de la enfermedad. El SG fue capaz de restaurar el balance homeostático de proteoglicanos tanto evitando su degradación (Gouze JN, 2001; Johnson KA, 2001; Sandy JD, 1998) como estimulando su síntesis (Bassleer C, 1998; McCarty MF, 2000). Parte de estos efectos podrían estar relacionados con la capacidad del SG para disminuir la síntesis de las metaloproteasas ya que existen datos en la literatura que demuestran que la activación del factor NF $\kappa$ B es esencial para la regulación de las metaloproteasas MMP-1, MMP-3 y MMP-13 (Bond M, 1999; Vicenti MP, 2002).

Hemos mostrado que varios de los fármacos incluidos en los estudios *in vitro* son capaces de regular la activación del NF $\kappa$ B. Existen varias secuencias de unión para NF $\kappa$ B en el promotor de los genes de la iNOS (Kleinert H, 2004), la COX-2 (Tanabe T, 2002) y las colagenasas MMP-1 y MMP-13 (Vicenti MP, 2002), lo que puede explicar la inhibición de la síntesis de estas proteínas, o de los mediadores que sintetizan, tras el tratamiento con los diferentes fármacos empleados en el estudio. Sin embargo otros factores de transcripción y rutas de transducción de señales han sido implicados en la regulación de la expresión génica de estas enzimas por la IL-1 $\beta$ . En particular, se ha demostrado que la activación de los factores de la familia C/EBP regula la expresión de la COX-2 en condrocitos estimulados con la IL-1 $\beta$  (Thomas B, 2000) y que el incremento en la expresión génica de la COX-2 que se produce tras la estimulación con la IL-1 $\beta$  están implicadas dos de las familias que forman parte de las MAPK, las JNK y p38 MAPK (Guan Z, 1998). En el promotor de la MMP-1 y la MMP-13 existe un sitio de unión a AP-1. Diferentes trabajos han demostrado que la sobreexpresión de c-jun, jun-B y c-fos está implicada en el incremento en la expresión génica de las dos colagenasas (Benbow U, 1997; Vicenti MP, 1996; Gack S, 1994). Además se ha observado que la inhibición de la actividad de la p38 MAPK bloquea el incremento de la expresión de la MMP-1 y la MMP-3 en fibroblastos sinoviales y en células vasculares inducido por la IL-1 $\beta$  (Ridley SH, 1997). Finalmente en la región promotora del gen que codifica para la iNOS existen sitios de unión para diferentes factores de transcripción como NF $\kappa$ B, AP-1, CREB y para la familia de las STAT (Aktan F, 2004). La activación de los factores de transcripción C/EBP y STAT-1 está implicada en la expresión de la iNOS en diferentes tipos celulares (Hecker M, 1999; Rao KM, 2000).

Con todos estos datos, parece claro que la expresión de estas enzimas *in vivo* está altamente regulada. Nuestro trabajo sólo trata de estudiar parte de las vías implicadas en la expresión de estas enzimas y mediadores en situaciones inflamatorias. Sería muy interesante estudiar si los fármacos utilizados en los experimentos *in vitro* son capaces de regular la unión de otros factores de transcripción al promotor de los genes diana, o modificar las rutas de señalización intracelulares que llevan a la activación de dichos factores.

## **VI. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> con el CBX o el ACF mejoró de forma similar el dolor y la función articular e indujo una disminución en la expresión y síntesis de la COX-2 y la mPGES-1 en la membrana sinovial de pacientes con artrosis de rodilla. Sin embargo no modificó la expresión de ninguno de los receptores EP, así como tampoco tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión de la iNOS en la membrana sinovial artrósica o sobre los niveles de NO en el líquido sinovial de los pacientes con OA.
2. Los dos fármacos utilizados en el estudio, el CBX y el ACF, parecen tener diferente perfil antiinflamatorio, de forma que la administración a largo plazo del CBX inhibía la expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  en comparación a pacientes no tratados y disminuía significativamente la presencia de macrófagos en comparación con el ACF, en la membrana sinovial de pacientes con OA de rodilla.
3. El tratamiento con el CBX disminuyó de forma significativa los niveles de la forma inactiva de la MMP-1 y aumentó los de la forma activa en comparación al grupo CONTROL en la membrana sinovial de los pacientes con OA de rodilla. Los resultados obtenidos tras el tratamiento con ACF mostraban una tendencia similar aunque no fueron estadísticamente significativos. Ninguno de los dos fármacos fue capaz de alterar la síntesis en el tejido sinovial artrósico de la MMP-3 en comparación al grupo CONTROL.
4. Mediante estudios *in vitro* comprobamos que diferentes compuestos de glucosamina eran capaces de inhibir la presencia de mediadores inflamatorios y de las enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular en condrocitos y sinoviocitos artrósicos. El SG y el HG disminuyeron la expresión génica y la síntesis de COX-2 y la liberación de PGE<sub>2</sub> y NO al sobrenadante celular tras la estimulación con IL-1 $\beta$ . También fueron capaces de controlar el incremento en la síntesis de la MMP-1 y la MMP-13 inducido por la estimulación de las células con la citoquina.
5. Sin embargo, otros SYSADOA, como el AcG, la DC y el C-6S, y la NAC solo controlaron parcialmente alguno de los mediadores proinflamatorios y de las enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular estudiados en condrocitos y sinoviocitos humanos en cultivo.
6. La presencia de diferentes AINE, como el CBX, el DCF, el MXC y la IND, en el medio de cultivo de condrocitos y sinoviocitos humanos inhibió la síntesis de la COX-2 y la liberación de la PGE<sub>2</sub> al sobrenadante celular. Sin embargo, no tuvieron ningún efecto, o incluso aumentaron la síntesis de la MMP-1 y la MMP-13, enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular.
7. La presencia del SG, el HG y la DC en el medio de cultivo celular inhibió la activación del NF $\kappa$ B inducida por la estimulación con la IL-1 $\beta$  tanto en condrocitos como en sinoviocitos humanos. Todos los

AINE, excepto la IND en sinoviocitos, inhibieron la activación del factor nuclear inducido por la estimulación con la citoquina.

8. El SG disminuyó la activación del NFκB mediante la inhibición de la degradación de la subunidad inhibitoria IκBα y de la translocación al núcleo de las subunidades p50 y p65 inducida por la estimulación con la IL-1β en condrocitos humanos en cultivo.

En conclusión, en esta tesis hemos demostrado que el tratamiento con fármacos inhibidores de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en pacientes con OA de rodilla induce una disminución en la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis de este prostanoido, como la COX-2 y la mPGES-1. Hemos descrito como dos AINE empleados en la actualidad en el tratamiento de la OA tienen un perfil diferente en cuanto al control de la inflamación sinovial, puesto que su efecto sobre la síntesis de citoquinas y la presencia de células inflamatorias en la membrana sinovial es diferente.

Mediante estudios *in vitro*, hemos demostrado que algunos compuestos derivados de la glucosamina son capaces de inhibir la síntesis de mediadores proinflamatorios así como la presencia de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Otros azúcares biológicos sólo controlan parcialmente alguno de estos mediadores. Los AINE inhibieron la ruta proinflamatoria más eficazmente que los otros compuestos utilizados en los estudios *in vitro*. Sin embargo, no modificaron o incluso activaron la síntesis de proteasas.

El planteamiento de este trabajo permite abrir nuevas hipótesis en cuanto a la presencia de mecanismos dependientes e independientes de PGE<sub>2</sub> que pueden controlar la inflamación sinovial durante la OA.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

- Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001;15:831-45.
- Abramson SB. Inflammation in Osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004;70:70- 76.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75:639-53.
- Alaaeddine N, di Battista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, et al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol* 1997;24:1985-94.
- Alvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, Sánchez-Pernaute O, Calvo E, Hernández M, Egido J, Herrero-Beaumont G. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis. Differential pro-inflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Ann Rheum Dis*. Published Online First: 13 February 2006. doi:10.1136/ard.2005.046920.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995;182:2097-02.
- Amin AR, Attur MG, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel R, Abramson SB. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage: influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 1997;99:1231-37.
- Amin AR. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:392-94.
- Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2672-9.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-57.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human Cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994;302:723-27.
- Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-15.
- Attur MG, Patel R, DiCesare PE, Steiner GC, Abramson SB, Amin AR. Regulation of nitric oxide production by salicylates and tenidap in human OA-affected cartilage, rat chondrosarcomas and bovine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:269-77.
- Attur MG, Patel RN, Patel PD, Abramson SB, Amin AR. Tetracycline up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E2 production independent of its effect on nitric oxide. *J Immunol* 1999;162:3160-67.
- Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR. Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J Immunol*. 2000;164:2684-91.



- Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:361-71.
- Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR. Nociception in cyclooxygenase isoenzyme-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97:10272-76.
- Bassleer C, Rovati L, Franchimont P. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6:427-34.
- Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS Jr. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 1993;13:3301-10.
- Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: A health status instrument for measuring clinically important participant relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in participants with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1998;15:1833-40.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995;372:83-87.
- Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997;15: 519-26.
- Benito-Ruiz P, Monfort-Faure J. Etiopatogenia, clasificación y epidemiología de la artrosis. En: Alonso-Ruiz A, Alvaro-Gracia JM, Andreu-Sánchez JL, Blanch-Rubió J, Collantes-Estévez E, Cruz-Martínez J y cols., directores. *Manual de la SER de las Enfermedades Reumáticas*. 3ª ed. Madrid: Ed. Panamericana. 2000:463-75.
- Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:616-22.
- Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 2001;44:437-50.
- Biggee BA, Blinn CM, McAlindon TE, Nuite M, Silbert JE. Low levels of human serum glucosamine after ingestion of glucosamine sulphate relative to capability for peripheral effectiveness. *Ann Rheum Dis* 2006;65:222-26.
- Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997;99:1534-45.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385:729-33.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 1995a;146:75-85.

- Blanco FJ, Lotz M. IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE<sub>2</sub>. *Exp Cell Res* 1995b;218:319–25.
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, De Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-89.
- Bond M, Baker AH, Newby AC. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:561-67.
- Brandt KD. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism in vitro and in vivo. *Am J Med* 1987;83:29-34.
- Brennan P, O'Neill LA. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kB activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* 1995;1260:167-75.
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: Subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:661-90.
- Burger D, Dayer JM. The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S169-176. 52. Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblast by celecoxib but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2002, 46:3159-67.
- Bunning RA, Russell RG. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 1989;32:780-84.
- Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996;39:1535–44.
- Cavallini L, Francesconi MA, Zoccarato F, Alexandre A. Involvement of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation in mitogen-induced lymphocyte proliferation: inhibitory effects of lymphoproliferation by salicylates acting as NF-kappaB inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:141–47.
- Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:387-94.
- Chen JT, Chen PL, Chang YH, Chien MW, Chen YH, Lu DW. Glucosamine sulfate inhibits leukocyte adhesion in response to cytokine stimulation of retinal pigment epithelial cells in vitro. *Exp Eye Res* 2006 Jul 3; [Epub ahead of print].
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:155-59.
- Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, Abramson SB. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol*. 2000;165:1582-87.

- Clancy RM, Gomez PF, Abramson SB. Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:552-58.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006;354:795-08.
- Clemett D, Goa KL. Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* 2000;59:957-80.
- Cooke TD, Bennett EL, Ohno O. The deposition of immunoglobulins and complement in osteoarthritic cartilage. *Int Orthop* 1980;4:211-17.
- Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 1997;24 (Suppl 49):15-19.
- Crofford LJ. COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:406-8.
- Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:61-98.
- Dayer JM, Krane SM, Russell RG, Robinson DR. Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:945-49.
- De Brum-Fernandes AJ, Morisset S, Bkaily G, Patry C. Characterization of the PGE2 receptor subtype in bovine chondrocytes in culture. *Br J Pharmacol* 1996;118:1597-04.
- De Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM, Cossermelli W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* 1997;46:72-77.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1989;84:678-85.
- DeWitt D, Smith WL. Yes, but do they still get headaches?. *Cell* 1995;83:345-48.
- Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, et al: Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts: Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* 1994;71:270-78.
- Di Battista JA, Dore S, Morin N, He Y, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J Cell Biochem*. 1997;65:408-19.
- Díaz-González F, González-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995;95:1756-65.
- Dodge GR, Regatte RR, Hall JO, Borthakur A, Sarma AV, Callaway DA, Ravinder RW. The fate of oral glucosamine traced by 13C-labeling in the dog. (Abstract). *Arthritis Rheum* 2001;44(9 Suppl): 1534.

- Dodge GR, Jimenez SA. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:424-32.
- Dolhain RJ, Tak PP, Dijkmans BA, De Kuiper P, Breedveld FC, Miltenburg AM. Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;37:502-08.
- Dougados M, Nguyen M, Berdah L, et al. Evaluation of the structure-modifying effects on diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three year, placebo controlled trial: evaluation of the chondromodulating effect of diacerein in OA of the hip. *Arthritis Rheum* 2001;44: 2539-47.
- Duff GW. Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1994;100:9-19.
- Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature* 2001;410:430-31.
- Fahmi H, He Y, Zhang M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Di Battista JA. Nimesulide reduces interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 gene expression in human synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:332-40.
- Fajardo M, Di Cesare PE Disease-modifying therapies for osteoarthritis: current status. *Drugs Aging* 2005;22:141-61.
- Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A et al Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:31720-31.
- Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:870-75.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1219-22.
- Fehrenbacher JC, Burkey TH, Nicol GD, Vasko MR. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E(2) receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells. *Pain* 2005;113:113-22.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis physiology. *Biorheology* 2002;39:237-46.
- Ferrari AJ, Van Linthoudt D, Morrone L, Branigan P, Schumacher HR, Baker DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins: their interactions and effects on the particulate-induced inflammatory process implicated in joint implant-loosening and monosodium urate crystal-induced inflammation. *Am J Ther* 1996;3:189-94.
- Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999;42:609-21.

- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265:16737-40.
- Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12:409-18.
- Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis*. 1997;56: 542-49.
- Gack S, Vallon R, Schaper J, Ruther U, Angel P. Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type-1 expression. Regulation of mouse metalloproteinases by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein. *J Biol Chem* 1994;269:10263-69.
- Giraud I, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC. Application to a cartilage targeting strategy: synthesis and in vivo biodistribution of (14)C-labeled quaternary ammonium-glucosamine conjugates. *Bioconjug Chem* 2000;11:212-18.
- Goetzl EJ, An S, Smith WL. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J* 1995;9:1051-58.
- Goldring MB, Berenbaum F. Human chondrocyte culture models for studying cyclooxygenase expression and prostaglandin regulation of collagen gene expression. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7:386-88.
- Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J. Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 2001;37:1171-82.
- Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO 3rd, Al-Mussawir H, Abramson SB. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 2005;175:6924-30.
- Gouze JN, Bordji K, Gulberti S, Terlain B, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:351-60.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
- Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-44.
- Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, Fowler B, Davis L, Hebert RL et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na+ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 1998;102:194-201.

- Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1/SEK1/MKK4/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1998;273:12901-08.
- Guicheux J, Palmer G, Relic B, Mezin F, Caverzasio J, Apostolides P, Gauchat JF, Gabay C, Guerne PA. Primary human articular chondrocytes, dedifferentiated chondrocytes, and synoviocytes exhibit differential responsiveness to interleukin-4: correlation with the expression pattern of the common receptor gamma chain. *J Cell Physiol* 2002;192:93-01.
- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res* 2004;423:17-26.
- Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-08.
- Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D Koki A, Tripp CS. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 2002;46:1789-803.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1632-38.
- Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y, Jasin HE. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1997;40:261-69.
- Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA. Inflammation and Angiogenesis in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2173-77.
- He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. Synthesis of interleukin 1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol* 2002;29:546-53.
- Hecker M, Cattaruzza M, Wagner AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *General Pharmacology* 1999;32:9-16.
- Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:747-55.
- Hemler M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 1976;251:5575-79.
- Herrero-Beaumont G, Román JA, Muñoz J, Blanco FJ, Benito P, Martín E, Paulino J, Marenco JL, Porto A, Laffon A, Araùjo D, Figueroa M, Branco. Effects of glucosamine sulfate on 6-month control of knee osteoarthritis symptoms vs. placebo and acetaminophen: results from the Glucosamine Unum In Die Efficacy (GUIDE) trial. *Arthritis Rheum* 2005;52 (9 Suppl):1203.
- Hochberg MC. Nutritional supplements for knee osteoarthritis--still no resolution. *N Engl J Med* 2006;354:858-60.
- Hoffer E, Baum Y, Nahir AM. N-Acetylcysteine enhances the action of anti-inflammatory drugs as suppressors of prostaglandin production in monocytes. *Mediators Inflamm* 2002;11:321-23.

- Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem.* 1993;268:7759-62.
- Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the function of neutrophils. *J Leukoc Biol* 2002;71:632-40.
- Hua J, Suguro S, Iwabuchi K, Tsutsumi-Ishii Y, Sakamoto K, Nagaoka I. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses the ADP-mediated platelet activation in humans. *Inflamm Res* 2004;53:680-88.
- Huskisson EC, Berry H, Gishen P, et al. Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1995; 22(10):1941-1946.
- Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y. Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2002;136:287-95.
- Iñiguez MA, Pablos JL, Carreira P, Cabre F, Gomez-Reino JJ. Detection of COX-1 and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint diseases. *Rheumatology* 1998;37:773-78.
- Isnard N, Robert L, Renard G Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol Int* 2003;27:779-84.
- Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science.* 1987;238:1132-34.
- Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Harazono A, Honda A, Watabe A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem.* 1993;217:313-18.
- Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human Prostaglandin E synthase: amicrosomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7220-25.
- Jee WS, Ueno K, Kimmel DB, Woodbury DM, Price P, Woodbury DM, Price P, Woodbury LA. The role of bone cells in increasing metaphyseal hard tissue in rapidly growing rats treated with prostaglandin E2. *Bone* 1987;8:171-78.
- Jiang B, Haverty M, Brecher P. N-Acetyl-L-Cysteine Enhances Interleukin-1  $\beta$ -Induced Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension* 1999;34:574-79.
- Jiang B, Brecher P. N-Acetyl-L-cysteine potentiates interleukin-1 $\beta$  induction of nitric oxide synthase : role of p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 2000;35:914-18.
- Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1560-70.
- Johnson KA, Hulse DA, Hart RC, Kochevart D, Chu Q. Effects of an orally administered mixture of chondroitin sulfate, glucosamine hydrochloride and manganese ascorbate on synovial fluid chondroitin sulfate 3B3 and 7D4 epitope in a canine cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:14-21.

- Jones A, Doherty M. Intraarticular corticosteroids are effective in osteoarthritis but there are no clinical predictors of response. *Ann Rheum Dis* 1996, 55:829-832.
- Kane D, Gogarty M, O'Leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004;50:3286-95.
- Kelly GS. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfate in the treatment of degenerative joint disease. *Alter Med Rev* 1998;3:27-39.
- Khachigian LM, Collins T, Fries JW. N-acetyl cysteine blocks mesangial VCAM-1 and NF-kappa B expression in vivo. *Am J Pathol* 1997;151:1225-29.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European J Pharmacol* 2004;500:255-66.
- Knott I, Dieu M, Burton M, Houbion A, Remacle J, Raes M. Induction of cyclooxygenase by interleukin 1: comparative study between human synovial cells and chondrocytes. *J Rheumatol* 1994;21:462-66.
- Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB: Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 1986;137:3189-94.
- Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Okamoto R, Koshino T, Kawai S. Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 2002;29:1836-42.
- Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48:2819-28.
- Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6: R355-65.
- Koki A, Khan NK, Woerner BM, Dannenberg AJ, Olson L, Seibert K, Edwards D, Hardy M, Isakson P, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol*. 2002;507:177-84.
- Krenn V, Moravietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, Köning A. Grading of chronic synovitis -a histopathological grading system for molecular and diagnosis pathology. *Pathol Res Pract* 2002;198:317-25.
- Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblasts by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. *Arthritis Rheum*. 2002;46:3159-67.
- Lappas M, Rice GE. Phospholipase A2 isozymes in pregnancy and parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:87-100.
- Largo R, Alvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkB activation. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:290-98.



- Largo R, Diez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, Lopez-Armada MJ, Alvarez-Soria MA, Egido J, Herrero-Beaumont G. EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1beta in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2004, 63:1197-204.
- Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998;38:981-93.
- Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Fahmi H. Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J. Rheumatol.* 2005; 32:887-95.
- Lopez-Armada MJ, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1027-30.
- López-Armada MJ, Carames B, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. Fisiopatología de la Artrosis: ¿cuál es la actualidad?. *Rev Esp Reumatol.* 2004;31:379-93.
- Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36:181-89.
- Lu-Suguro JF, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Inhibitory action of glucosamine on platelet activation in guinea pigs. *Inflamm Res* 2005;54:493-99.
- Ma L, Rudert WA, Harnaha J, Wright M, Machen J, Lakomy R, Qian S, Lu L, Robbins PD, Trucco M, Giannoukakis N. Immunosuppressive effects of glucosamine. *J Biol Chem* 2002;277:39343-49.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53:523-37.
- Manning AM, Anderson DC. Transcription factor NF-κB: an emerging regulator of inflammation. *Ann Rep Med Chem* 1994;29:235-44.
- Marotta P, Sautebin L, Di Rosa M. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. *Br J Pharmacol.* 1992;107:640-41.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Di Battista J, Faure M-P, Chin JA, Fournier S, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes: identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992;35:530-40.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 1994;70:807-15.
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:155-67.
- Martel-Pelletier J, di Battista JA, Lajeunesse D. Biochemical factors in joint articular tissue degradation in osteoarthritis. In: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis: clinical and experimental aspects.* Berlin: Springer-Verlag; 1999:156-87.
- Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:84-6.

- Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB, Thirion S. Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways, *Arthritis Rheum.* 2004;50: 2829-38.
- Mathy-Hartert M, Deby-Dupont GP, Reginster JY, Ayache N, Pujol JP, Henrotin YE. Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1beta, nitric oxide and prostaglandin E(2) production by human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:547-55.
- Matsuda K, Nakamura S, Matsushita T. Celecoxib inhibits nitric oxide production in chondrocytes of ligament-damaged osteoarthritic rat joints. *Rheumatol Int* 2006;26:1-5.
- McCarty MF, Russell AL, Seed MP. Sulfated glycosaminoglycans and glucosamine may synergize in promoting synovial hyaluronic acid synthesis. *Med Hypotheses* 2000;54:798-02.
- McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996;184:1519-24.
- McKenzie LS, Horsburgh BA, Ghosh P, Taylor TK. Effect of anti-inflammatory drugs on sulphated glycosaminoglycan synthesis in aged human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1976;35:487-97.
- Mehindate K, al-Daccak R, Dayer JM, Kennedy BP, Kris C, Borgeat P, Poubelle PE, Mourad W. Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol.* 1995;155:3570-77.
- Milano S, Arcoleo F, Dieli M, et al: Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 1995; 49:105-15.
- Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996;97:761-68.
- Miyaura C, Inada M, Suzawa T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T. Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP-4-knockout mice. *J Biol Chem* 2000;275:19819- 23.
- Moore AR, Greenslade KJ, Alam CA, Willoughby DA. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:19-23.
- Moore BC, Simmons DL. COX-2 inhibition, apoptosis and chemoprevention by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Curr Med Chem* 2000;7:1131-44.
- Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol* 2005;115:118-28.
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995; 83:473- 82.
- Moritani, N. H., Kubota, S., Eguchi, T., Fukunaga, T., Yamashiro, T., Takano-Yamamoto, T., Tahara, H., Ohyama, K., Sugahara, T., and Takigawa, M. Interaction of AP-1 and the ctgf gene: a possible driver of chondrocyte hypertrophy in growth cartilage. *J. Bone Miner. Metab.* 2003;21:205-10.

- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:32783-92.
- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T. Cellular prostaglandin E2 production by membrane bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenase-1 and -2. *J Biol Chem* 2003;278:37937-47.
- Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002; 4 (Suppl 3): S39-49.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-26.
- Nathan C, Xie Q. Nitric Oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915.
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 1997;100:2417-23.
- Neidhart M, Gay RE, Gay S. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2000;43:1719-28.
- Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001;107:35-44.
- Nguyen M, Dougados M, Berdah L, Amor B. Diacerein in the treatment of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1994;37:529-36.
- Nicolas P, Tod M, Padoin C, Petitjean O. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 1998;35:347-59.
- Nishida K, Doi T, Matsuo M, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Yoshida A, Shibahara M, Inoue H. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:232-37.
- Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. Relationship between pain-related mediators and both synovitis and joint pain in patients with internal derangements and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:328-32.
- Nolla Solé JM, Valverde García J. Los glucocorticoides. En: Egido J, Gómez-Reino J, Herrero-Beaumont G, Rodríguez de la Serna A, directores. *Manual de Inflamación.* Medical & Marketing Communications SL; 1999: 425-36.
- Noguchi K, Iwasaki K, Shitashige M, Ishikawa I. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes downregulate tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1999;34:478-85.

- Noguchi K, Shitashige M, Endo H, Kondo H, Ishikawa I. Binary regulation of interleukin-6 production by EP1 and EP2/EP4 subtypes of PGE2 receptors in IL-1 -stimulated human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 2002;37:29-36.
- Noguchi K, Ruwanpura SM, Yan M, Yoshida N, Ishikawa I. Down-regulation of interleukin-1alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression via EP1 receptors by prostaglandin E2 in human periodontal ligament cells. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:56-59.
- Nuki G. Role of mechanical factors in the aetiology, patogénesis and progression of osteoarthritis. En: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, directores. *Osteoarthritis : clinical and experimental aspects*. Berlin. Ed. Springer-Verlag ; 1999: 101-14.
- Origuchi T, Migita K, Nakashima T, Honda S, Yamasaki S, Hida A, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human osteoblastic cells by N-acetylcysteine. *J Lab Clin Med* 2000;136:390-94.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. N-acetyl cysteine inhibits induction of no production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 1998;24:39-48.
- Palacios I, Lopez-Armada MJ, Hernandez P, Sanchez-Pernaute O, Gutierrez S, Miguelez R, et at. Tenidap decreases IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 (MCP-1) mRNA expression in the synovial tissue of rabbits with antigen arthritis and in cultured synovial cells. *Clin Exp Immunol* 1998;11:588-96.
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006;119:229-40.
- Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, Machacek S, Giacovelli G, Rovati LC. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebocontrolled, double-blind study. *Arch Intern Med* 2002;162:2113-23.
- Pelletier JM, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandins in Articular Tissues. *Sem Arthr Rheum*. 2003;30:155-67.
- Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1Ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:77-84.
- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.
- Pelletier JP. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *A Textbook of Rheumatology. Arthritis and Allied Conditions*. 2001a:1969-84.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001b;44:1237-47.
- Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J, Moldovan F, Schrier D, Flory C, Martel-Pelletier J. In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes. *Arthritis Rheum* 2003;48:1582-93.

- Persiani S, Roda E, Rovati LC, Locatelli M, Giacovelli G, Roda A. Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis Cartilage* 2005a;13:1041-49.
- Persiani S, Rotini R, Trisolino G, et al. Glucosamine plasma and synovial fluid concentrations before and after oral administration of crystalline glucosamine sulfate in knee osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 2005b;52 (9 suppl):1342.
- Pillinger MH, Rosenthal PB, Tolani SN, Apsel B, Dinsell V, Greenberg J, Chan ES, Gomez PF, Abramson SB. Cyclooxygenase-2-derived E prostaglandins down-regulate matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblast-like synoviocytes via inhibition of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Immunol* 2003;171:6080-89.
- Piperno M, Reboul P, Hellio Le Graverand MP, Peschard MJ, Anfeld M, Richard M, Vignon E. Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:207-12.
- Plaksin D, Baeuerle PA, Eisenbach L. KBF1 (p50 NF- $\kappa$ B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med* 1993;177:1651-62.
- Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structure and functions *Biochem J.* 1986; 236:1-14.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 1996;184:883-91.
- Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2006;73:29-36.
- Rao KM. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B. Critical Reviews* 2000;3: 27-58.
- Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994;2:199-06.
- Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, Gil DW. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol.* 1994;46:213-20.
- Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1338-49.
- Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, Giacovelli G, Henrotin Y, Dacre JE, Gossett C. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* 2001;357:251-56.
- Regnier C, Song H, Gao X, Goeddel D, Cao Z, Rothe, M. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* 1997;90:373-83.
- Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y, Reginster JY. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch Intern Med* 2003;163:1514-22.

- Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen activated protein kinase: Regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997;158:3165-73.
- Roshak A, Jackson JR, Chabot-Fletcher M, Marshall LA. Inhibition of NFkappaB-mediated interleukin-1beta-stimulated prostaglandin E2 formation by the marine natural product hymenialdisine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:955-61.
- Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999;1999:RE1.
- Sadouk M, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Human synovial fibroblasts coexpress interleukin-1 receptor type I and type II mRNA: the increased level of the interleukin-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest* 1995;73:347-55.
- Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9:407-15.
- Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of polysulfated glycosaminoglycan and triamcinolone acetonid on the production of proteinases and their inhibitors by IL-1alpha treated articular chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 2002;64:217-27.
- Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier J-P, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. Interleukin-1b-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1b and interleukin-18. *Arthritis Rheum* 1999;42:1577-87.
- Saha S, Engstrom L, Mackerlova L, Jakobsson PJ, Blomqvist A. Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1100-07.
- Sahap Atik O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990;39:253-254.
- Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:156-62.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7240-44.
- Salvemini D, Manning PT, Zweifel BS, Seibert K, Connor J, Currie MG, Needleman P, Masferrer JL. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J Clin Invest*. 1995;96:301-08.
- Sanchez C, Mateus MM, Defresne MP, Crielaard JM, Reginster JY, Henrotin YE. Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Rheumatol* 2002;29:772-82.
- Sanchez C, Mathy-Hartert M, Deberg MA, Ficheux H, Reginster JY, Henrotin YE. Effects of rhein on human articular chondrocytes in alginate beads. *Biochem Pharmacol* 2003;65:377-88.

- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3:107-113.
- Sandy JD, Gamett D, Thomson V, Verscharen C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine. *Biochem J* 1998;335:59-66.
- Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem* 1998;123:431-39.
- Schumacher HR Jr. Synovial inflammation, crystals, and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995;43 (suppl):101-03.
- Schumacher HR, Meng Z, Sieck M, Zonay L, Clayburne G, Baker JF et al. Effect of a nonsteroidal antiinflammatory drug on synovial fluid in osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996;23:1774-77.
- Setnikar I, Rovati LC. Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. *Arzneimittelforschung* 2001;51:699-25.
- Sharif M, Shepstone L, Elson CJ, Dieppe PA, Kirwan JR. Increased serum C reactive protein may reflect events that precede radiographic progression in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:71-74.
- Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:133-40.
- Shikhman AR, Kuhn K, Alaaeddine N, Lotz M. N-acetylglucosamine prevents IL-1 $\beta$ -mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol* 2001;166:5155-60.
- Shikhman AR, Amiel D, D'Lima D, Hwang SB, Hu C, Xu A, Hashimoto S, Kobayashi K, Sasho T, Lotz MK. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:89-94.
- Siegle I, Klein T, Backman JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum* 1998;41:122-29.
- Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK. Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem*. 1993;268:2513-24.
- Smith GN Jr, Myers SL, Brandt KD, Mickler EA, Albrecht ME. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:545-54.
- Smith MD, Triantafyllou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1997;24:365-71.
- Smith WL, DeWitt DL, Kraemer SA, Andrews MJ, Hla T, Maciag T, Shimokawa T. Structure-function relationships in sheep, mouse, and human prostaglandin endoperoxide G/H synthases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1990;20:14-21.

- Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991;1083:1-17.
- Song X, Lin HP, Johnson AJ, Tseng PH, Yang YT, Kulp SK et al. Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:585-91.
- Sorrell JM, Mahmoodian F, Schafer IA, Davis B, Caterson B. Identification of monoclonal antibodies that recognize novel epitopes in native chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycan chains: their use in mapping functionally distinct domains of human skin. *J Histochem Cytochem* 1990;38:393-402.
- Spaziani EP, Benoit RR, Tsibris JC, Gould SF, O'Brien WF. Tumor necrosis factor-alpha upregulates the prostaglandin E2 EP1 receptor subtype and the cyclooxygenase-2 isoform in cultured amnion WISH cells. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:1039-44.
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998;273:9886-93.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258:1898-02.
- Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson P, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol*. 2001;167:469-74.
- Su S, Grover J, Roughley PJ, DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Zafarullah M. Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int*. 1999;18:183-91.
- Subhashini J, Mahipal SV, Reddanna P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett* 2005;16:31-43.
- Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem*. 1992;267:6463-66.
- Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 2001;44:1897-07.
- Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
- Takada Y, Huang C, Hemler ME. Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. *Nature*. 1987;326:607-09.
- Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 2004;23:9247-58.
- Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Mori S, Morichika T, Itoh H, Yokoyama M, Kubo S, Kondo E, Akagi T, Tanaka N, Nishibori M. Prostaglandin E(2) inhibits IL-18-induced ICAM-1 and B7.2



- expression through EP2/EP4 receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2002;168:4446-54.
- Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA Jr, Libby P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 2002;277:44147-54.
  - Tamura T, Kosaka N, Ishiwa J, Sato T, Nagase H, Ito A. Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and up-regulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:257-63.
  - Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostag Lipid Med* 2002;68:95-114.
  - Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;275:32775-82.
  - Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Bereziat G, Crofford L, Olivier JL. Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem* 2000;267:6798-09.
  - Tiralocche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Laverty S. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1118-28.
  - Tsao PW, Suzuki T, Totsuka R, Murata T, Takagi T, Ohmachi Y, Fujimura H, Takata I. The effect of dexamethasone on the expression of activated NF-kappa B in adjuvant arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:173-78.
  - Tsuji, M., Funahashi, S., Takigawa, M., Seiki, M., Fujii, K., and Yoshida, T. Expression of c-fos gene inhibits proteoglycan synthesis in transfected chondrocyte. *FEBS Lett.* 1996;381:222-26.
  - Tufan, AC, Daumer, K. M., DeLise, A. M., and Tuan, R. S. AP-1 transcription factor complex is a target of signals from both Wnt-7a and N-cadherin-dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* 2002;273:197-03.
  - Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, Kwiatkowski D. Functional consequences of a polymorphism affecting NF- $\kappa$ B p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 2000;20:9113-19.
  - Walling HW, Raggatt LJ, Irvine DW, Barmina OY, Toledano JE, Goldring MB, Hruska KA, Adkisson HD, Burdge RE, Gatt CJ, Harwood DA and Partridge NC. Impairment of the collagenase-3 endocytotic receptor system in cells from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:854-63.
  - Van de Loo FAJ, Joosten LAB, van Lent PLEM, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction: effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:164-72.

- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature* 1971;231:232-35.
- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol* 1996;25:9-21.
- Verbruggen G, Goemaere S, Veys EM. Systems to assess the progression of finger joint osteoarthritis and the effects of disease modifying osteoarthritis drugs. *Clin Rheumatol* 2002;21:231-43.
- Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Feb;45:129-38.
- Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): Mechanism that control enzyme activity, transcription and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryol Gene Exp* 1996;6:391-11.
- Vicenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signalling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 2002;4:157-64.
- Wakefield RJ, Conaghan PG, Gibbon WW et al. High resolution ultrasound detects synovitis in the majority of patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998, 41:S146.
- Walling HW, Raggatt LJ, Irvine DW, Barmina OY, Toledano JE, Goldring MB, Hruska KA, Adkisson HD, Burdge RE, Gatt CJ, Harwood DA and Partridge NC. Impairment of the collagenase-3 endocytotic receptor system in cells from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11: 854–863.
- Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res* 2002; 62:2029-33.
- Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumour necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol* 1994;21:1710-15.
- Westman M, Korotkova M, af Klint E, Stark A, Audoly LP, Klareskog L, Ulfgren AK, Jakobsson P. Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium, *Arthritis Rheum*. 2004;50:1774–80.
- Whatabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie T, Namba M, Negishi S, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP-1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 1993;268:20175-78.
- Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997;8:75-82.
- Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA. In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum* 1993;36:1444-50.
- Wilkison LS, Pitsillides AA, Worrall JG, and Edwards JC. Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum*. 1992;35:1179-84.

- Yamane H, Sugimoto Y, Tanaka S, Ichikawa A. Prostaglandin E(2) receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF-alpha and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:224-8.
- Yaron M, Shirazi I, Yaron I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:272-80.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:455-61.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:6-20.
- Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, de Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 2004;215:1-20.
- Zhang Y, Guan Y, Schneider A, Brandon S, Breyer RM, Breyer MD. Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E (2) receptors. *Hypertension* 2000;35:1129-34.

**Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:**

- R Largo, **MA Alvarez-Soria**, I Díez-Ortego, E Calvo, O Sanchez-Pernaute, J Egido, G Herrero-Beaumont. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkB activation. Osteoarthritis Cartilage 11:290-298, 2003.
- **Álvarez-Soria MA**, Largo R, Santillana J, Sánchez-Pernaute O, Calvo E, Hernández M, Egido J, Herrero-Beaumont G. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis. differential anti-inflammatory profile of Celecoxib. Ann Rheum Dis.65 998-1005, 2006.
- **Alvarez-Soria, MA**, Largo R, Sanchez-Pernaute O, Egido, J, Herrero-Beaumont G. Prostaglandin E2 receptors EP1 and EP4 are up-regulated in rabbit chondrocytes by IL-1, but not by TNF. Rheumatology International (en revisión).
- **Álvarez-Soria MA**, Herrero-Beaumont G, Sánchez-Pernaute O, Egido J, Largo R. Differential Anticatabolic Profile Of Glucosamine-containing Compounds Versus Other Anti-Osteoarthritic Drugs On Human Osteoarthritic Chondrocytes And Synovial Fibroblast In Culture. J Pharmacol Exp Ther (en revisión).

**Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:**

- Sánchez-Pernaute, R Largo, E Calvo, **MA Alvarez-Soria**, J Egido, G Herrero-Beaumont. A Fibrin based model for rheumatoid synovitis. Ann. Rheum. Dis. 62:1135-1138, 2003.
- R Largo, I Díez-Ortego, O Sanchez-Pernaute, **MA Alvarez-Soria**, J Egido, G Herrero-Beaumont. NSAIDs increase monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression induced by interleukin-1b in Synovial Fibroblast. An antiinflammatory role for PGE2 EP2/EP4 receptors. Ann Rheum Dis 63:1197-1204, 2004.
- Sanchez-Pernaute O, Esparza-Gordillo J, Largo R, Calvo E, **Alvarez Soria MA**, Marcos ME, Herrero Beaumont G, Rodriguez de Cordoba S. Expression of the peptide C4b-binding protein beta (C4BP& [beta]) in the arthritic joint. Ann Rheum Dis. published online 5 May 2006; doi:10.1136/ard.2006.052118.
- Herrero-Beaumont G, Rovati LC, Casteñeda S, **Alvarez Soria MA**, Largo R. The reversed pathway of Glucosamine Sulphate: from the empiric clinical practice to a scientific based use in knee OA. Expert Opin Pharmacother (en revisión).

**Estos resultados han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:**

**Congresos internacionales:**

- 65<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. SAN FRANCISCO, 2001. R Largo, I Díez-Ortego, O Sanchez-Pernaute, **MA Alvarez-Soria**, J Egido, G Herrero-Beaumont. Prostaglandin E2 downregulates interleukin-1b-induced monocyte

chemoattractant protein-1 expression via ep2/ep4 receptors in synovial fibroblast in culture. *Arthritis Rheum* 2001; 44 (suppl 9): S108.

- 22<sup>ND</sup> EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH. O Sánchez-Pernaute, R Largo, I Díez-Ortego, **MA Alvarez-Soria**, E Calvo, M López-Armada, G Herrero-Beaumont. Interaction of intimal fibroblasts with intracavitary fibrin: a morphologic follow-up in ovalbumin arthritis.. *Arthritis Research* 2002; 4(suppl 1): A4.
- 66<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. NUEVA ORLEANS, 2002 Olga Sánchez-Pernaute, Jorge Esparza-Gordillo, Raquel Largo, Irene Díez-Ortego, Pilar Sánchez-Corral, Olga Criado, Emilio Calvo, **María A Alvarez-Soria**, Gabriel Herrero-Beaumont, Santiago Rodríguez de Córdoba. Production of Complement C4b-Binding Protein Beta (C4BP $\beta$ ), a Procoagulant Protein in the Rheumatoid Joint Arthritis Rheum. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (suppl 9): S39.
- 66<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. NUEVA ORLEANS, 2002 Olga Sánchez-Pernaute, Raquel Largo, Irene Díez-Ortego, **María A Alvarez-Soria**, Emilio Calvo, María J López-Armada, Jesús Egido, Gabriel Herrero-Beaumont. Fibrin Clots Generated in the Synovial Fluid Activate Lining Fibroblasts from Their Apical Surface. A Sequential Study in Ovalbumin. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (suppl 9): S 39.
- 66<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. NUEVA ORLEANS, 2002. **MAngeles Alvarez-Soria**, Raquel Largo, Irene Díez-Ortego, Emilio Calvo, Olga Sanchez-Pernaute, Jesus Egido, Gabriel Herrero-Beaumont. Glucosamine Inhibits IL-1 $\beta$ -induced NF-kappa B Activation in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (suppl 9): S83.
- ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY EULAR 2003. Lisboa. O Sánchez-Pernaute, J Esparza-Gordillo, R Largo, P Sánchez-Corral, O Criado, E Calvo, **MA Alvarez-Soria**, G Herrero-Beaumont, S Rodríguez de Córdoba Production of complement c4-binding protein in the inflamed synovium: a role for complement activation in the local thrombophilia of rheumatoid joints. *Ann Rheum Dis.* 62 (suppl 1):S380, 2003.
- 9<sup>TH</sup> WORLD CONGRESS OF THE OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNATIONAL. Chicago 2004. Long term celecoxib treatment directly decreases COX-2 synthesis and macrophage infiltration in OA synovial membrane independently of PGE2 inhibition. **MA Alvarez-Soria**, R Largo, J Santillana, O Sanchez-Pernaute, E Calvo, J Egido, G Herrero-Beaumont. *Osteoarthritis Cartilage* 12:S71, 2004.
- ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY. Viena. Junio, 2005. **Alvarez Soria MA**, Largo R, Santillana J, Sanchez-Pernaute O, Calvo E, Egido J, Herrero-Beaumont G. Long-term celecoxib treatment decreases COX-2 synthesis and macrofages infiltration in human OA synovial membrane independtly of PGE-2 inhibition. *Annal Rheumatic Diseases* 2005; 64: 496.
- 10<sup>th</sup> WORLD CONGRESS OF THE OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNATIONAL. Boston 2005. Differential anticatabolic profile of glucosamine sulfate versus other anti-osteoarthritic drugs on human osteoarthritic chondrocytes and synovial fibroblast in

culture. **M A Alvarez-Soria**, R Largo, E Calvo, J Egido, and G Herrer-Beaumont. Osteoarthritis Cartilage 2005; 13: S153.

- 10<sup>th</sup> WORLD CONGRESS OF THE OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNATIONAL. Boston 2005. Prostaglandin e2 receptors ep1 and ep4 are upregulated in rabbit chondrocytes by IL-1 but not by TNF. O Sanchez-Pernaute, R Largo, **M A Alvarez-Soria**, and G Herrero-Beaumont. Osteoarthritis Cartilage 2005; 13: S157.

### **Congresos nacionales.**

- IV CONGRESO ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA. Oviedo Enero 2003. R. Largo, **MA Alvarez-Soria**, E Calvo, O Sánchez-Pernaute, J Egido, G Herrero-Beaumont. El sulfato de glucosamina inhibe la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos en cultivo. Comunicación oral.
- XXIX CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Bilbao. Mayo 2003. C. Bordoy Ferrer, R Largo, M Alcalde, **MA Alvarez-Soria**, O Sanchez-Pernaute, JC Acebes, G Herrero-Beaumont. Activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1 en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con artritis reumatoide. Rev. Esp Reumatología. 30(5):231, 2003. Poster.
- VI CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES ÓSEAS Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM).- Las Palmas.- Octubre 2003. **MA Alvarez**, R Largo, I Díez, E Calvo, O Sánchez, J Egido, G Herrero-Beaumont. La glucosamina inhibe la activación del nf-kappa B inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos de enfermos artrosicos. Revista Española de Enfermedades Metabólicas Oseas, 2003.
- VII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIONES ÓSEAS Y METABOLISMO MINERAL (SEIOMM). Cáceres 2004. S Castañeda, R Largo, F Rodríguez-Salvanez, E Calvo, ME Marcos, **MA Alvarez**, M Díaz-Curiel, G Herrero-Beaumont. Caracterización de la osteoporosis en conejos en un modelo combinado de ooforectomía y glucocorticoides. Presentación oral. Revista Española de Enfermedades Metabólicas Oseas (REEMO) 13(5):103, 2004.
- 41 CONGRESO NACIONAL SECOT. MADRID 2004. S. Castañeda, E. Calvo, R. Largo, F Rodríguez, E. Marcos, , **M. A. Álvarez**, M. Díaz Curiel, G. Herrero-Beaumont. Caracterización de la osteoporosis en conejos en un modelo combinado de ooforectomía (OVX) y glucocorticoides (GC).