

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS MOLECULARES



***NUEVOS AVANCES EN EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS:
TERAPIAS INNOVADORAS PARA LA
ARTROSIS Y LA OSTEOPOROSIS***

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO MIGUEL CONESA BUENDÍA

MADRID, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



***NUEVOS AVANCES EN EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS:
TERAPIAS INNOVADORAS PARA LA
ARTROSIS Y LA OSTEOPOROSIS***

Memoria de Investigación presentada por **Francisco Miguel Conesa Buendía**, Graduado en Bioquímica y con Máster en Biología Molecular Aplicada a Empresas Biotecnológicas, para optar al grado de **Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por la **Dra. Aránzazu Mediero Muñoz** y la **Dra. Arantxa Ortega de Mues**

Madrid, 2019

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de la **Dra. Aránzazu Mediero Muñoz** y la **Dra. Arantxa Ortega de Mues** en el Laboratorio de Reumatología y Metabolismo Óseo del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) UAM, Madrid (España). **Francisco Miguel Conesa Buendía** ha sido financiado por una beca Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz (2017-2019) con el apoyo del *Madrid College of Chiropractic* y el Real Centro Universitario Escorial-María Cristina.



REAL CENTRO U
NIVERSITARIO
Escorial – María Cristina

Doña Aránzazu Mediero Muñoz, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Complutense de Madrid y **Doña Arantxa Ortega de Mues**, Doctora en Biología Celular y Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **Don Francisco Miguel Conesa Buendía**, Graduado en Bioquímica por la Universidad de Murcia y con Máster en Biología Molecular Aplicada a Empresas Biotecnológicas por la Universidad de Granada, ha realizado en el Laboratorio de Reumatología y Metabolismo Óseo del Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Madrid, a 2 de septiembre de 2019,

Dra. Aránzazu Mediero Muñoz

Dra. Arantxa Ortega de Mues

Doctorando: Francisco Miguel Conesa Buendía

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Avenida de los Reyes Católicos 2; 28040, Madrid

A mis padres

A mi abuela

A Belén

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Llegado a este punto y viendo el trabajo de 3 años plasmado en este manuscrito, solamente me queda agradecer a todos aquellos que han contribuido y han hecho posible que todo este esfuerzo haya merecido la pena.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Gabriel Herrero-Beaumont y a la Dra. Raquel Largo la oportunidad que me otorgaron de poder realizar la tesis doctoral en el laboratorio de fisiopatología ósea del IIS-FJD, el cual dirigen. Además, también quisiera agradecerles la ayuda y el asesoramiento científico que me han brindado durante estos años.

Por otro lado, quisiera darle las gracias a la Fundación Conchita Rábago que posibilitó mi financiación en forma de beca para que pudiese realizar mi trabajo de tesis doctoral en la Fundación Jiménez Díaz. No obstante, este apoyo económico no hubiera sido posible sin la contribución del *Madrid College of Chiropractic* y el Real Centro Universitario Escorial-María Cristina.

De estas dos últimas instituciones surge la figura que ha movido cielo y tierra para que estos 3 años de trabajo hayan sido una realidad, me refiero a la Dra. Arantxa Ortega, mi co-directora de tesis. Arantxa, desde el primer momento me has transmitido tu energía, pasión y entrega a la ciencia, demostrándome el verdadero valor de las cosas y la ilusión y ganas de superarse a uno mismo. Gracias por tu apoyo constante, trabajo, dedicación y lecciones de vida. Ya sabes que esto es sólo el comienzo de algo grande que te tiene preparado la ciencia, porque con esa actitud, por grande que sea la montaña, no podrá contigo.

De vuelta al laboratorio, he tenido la suerte de coincidir y comenzar esta carrera investigadora con la Dra. Aránzazu Mediero, mi directora de tesis. Desde el día 0, te has entregado y me has ayudado a formar y pulir poco a poco al científico que a día de hoy soy. A ti Arancha te quiero agradecer todo el esfuerzo que has volcado en mí; las lecciones y enseñanzas que me has ido transmitiendo a lo largo de estos 3 años se vienen conmigo en la mochila para siempre. Muchas gracias por todo tu apoyo a lo largo de la tesis doctoral y por las oportunidades que me has brindado para poder mejorar y curtirme en ciencia.

Es en el laboratorio, nuestra segunda casa, donde he tenido la gran suerte de compartir poyata y escritorio con el mejor grupo humano y científico de la Fundación Jiménez Díaz. A todos vosotros os debo un pedazo de esta tesis, y aquí lo tenéis.

Sandra, desde el primer día has estado siempre disponible para solucionar dudas, preguntas o inquietudes que con la mejor de las sonrisas has dado respuesta. Muchas gracias por estar apoyándome y ayudándome en mis comienzos y día a día en mi aventura científica. Ha sido una suerte poder tenerte como *senior* en el laboratorio.

Paula, por orden jerárquico eres la segunda de las “pres” en mi lista. Durante estos tres años hemos convivido y compartido muchas aventuras y anécdotas que creo que nunca vamos a olvidar. Espero que el futuro te depare muchos éxitos, no dudo que así será y que realmente no se pierda el contacto y la amistad cosechada. Muchas gracias por tu ayuda y disposición diaria.

Seguimos avanzando por el laboratorio y me encuentro con Ana, una de las personas más concienzudas, aplicadas y perseverantes que he conocido. Tu espíritu investigador se palpa y contagia en cada rincón del laboratorio. Durante estos años ha sido una suerte compartir contigo tu bondad y buen saber de la ciencia, e igualmente te digo, espero que nunca perdamos el contacto y sigamos aprendiendo idiomas juntos. Mucha suerte en tus próximos retos, el futuro te espera con el Nobel en la mano.

A continuación nos encontramos con Juan Pablo, Juanpa para los amigos. Entramos a la vez en el laboratorio y ya desde el primer día vi que me costaría entablar una conversación larga y con sentido contigo. Bueno Juanpa, ahora hablando en serio, poco a poco durante estos 3 años hemos ido forjando una bonita amistad, conociéndonos y compartiendo momentos y vivencias que nos han ayudado a hacer el día a día más llevadero. Dado quizás que éramos los dos únicos chicos predoctorales en el laboratorio, hemos tenido un *feeling* especial, compartiendo nuestras opiniones y anécdotas. Me llevo una gran persona.

De reciente incorporación a predoctoral casi consagrado tenemos a Ismael. Poco ha sido el tiempo que hemos necesitado para entendernos. La verdad que tu llegada ha animado un poco más el ambiente musical del grupo, transmites mucho entusiasmo por la ciencia y un gran interés y vocación por lo que haces. Sé de sobra que vas a conseguir tus objetivos y que la tesis es cuestión de meses... Ha sido un placer compartir contigo mi última etapa en el laboratorio, pese a que me hubiera gustado forjar más lazos y convivencias contigo. Ánimo con la tesis y ya sabes que si algún día decides dedicarte a la música llámame, te representaré sin problema.

Finalmente, me gustaría también agradecer a Patri todo el trabajo y ayuda prestada durante estos años en los que hemos compartido poyata. Te deseo mucha suerte en el futuro, sigue así con esa actitud y vitalidad y nada se te resistirá.

Y no solamente en el laboratorio he tenido la suerte de conocer gente magnífica, rodeándonos he podido encontrar personas maravillosas: Lara, por tu carácter extrovertido y vitalidad descomunal, gracias por tus constantes visitas; Melani, Marta, Ruth de anatomía por ese buen rollo que transmitís; Olaya, Dani, Álvaro, por los buenos ratos que hemos pasado fuera del laboratorio. Especialmente, quería dedicar unas palabras a otra de esas personas que siempre encuentras cuando necesitas: Julia. Muchas gracias por tu carácter, por tu alegría y por tu bondad, porque cada visita al laboratorio fue un momento de desconexión, risas y paz.

Dando el salto traslacional, quería también agradecer a todo el servicio de Reumatología y de Medicina Interna e Infecciosas del hospital. Gracias al trabajo llevado a cabo y las colaboraciones tanto prácticas como en seminarios y charlas que me han aportado mucho conocimiento clínico y de aplicación en mi trabajo.

Un poco más lejos, pero a la vez muy cerca de mí, tengo muy presente en estos momentos a la familia López-Cruz. Alberto, Marlid y Gabo amigos y casi familia mexicana, el destino, tan caprichoso como siempre, nos brindó la suerte de coincidir el año pasado en Madrid. Solamente un año nos sirvió y bastó para entablar una amistad para toda la vida. Mil gracias por todos los buenos momentos que nos hicisteis pasar, por todas las aventuras y convivencias que tuve la suerte de compartir con vosotros, por haberme enseñado a ser mejor

persona. Sois de esas personas que hacen mella y mucha mella, increíblemente bondadosos y generosos. Mil gracias de nuevo por todo, nos vemos pronto en México para celebrarlo.

También quiero dedicarle unas palabras a aquellos que desde la infancia me han acompañado en el camino: Jaime, Miguel Ángel, Diego y un largo etc. Gracias por ser como sois y por estar siempre ahí cuando os necesito. Aunque siempre en la distancia, nuestra unión es permanente e inquebrantable.

Sin duda y sin menospreciar a los demás, creo que el verdadero apoyo desde hace años ha venido desde casa, a vosotros mis padres os debo todo, desde siempre me habéis apoyado en mis decisiones aún sin saber muy bien que implicaba ello. Hemos pasado situaciones difíciles que me han hecho aprender y aún a día de hoy sigo aprendiendo. Fruto de ello es la persona que soy y el orgullo que me ocasiona. Y aunque no estés presente para poder disfrutar conmigo este logro, sé que desde donde estés abuela, te sentirás súper orgullosa de ver que lo que desde bien pequeño auguraste en mí, hoy se cumple. Os quiero.

Hasta aquí todos los presentes podría decir que han conocido y “soportado” al mejor Fran, pero hay alguien que también ha tenido que aguantar y mucho al Fran más demoledor. A ti Belén me faltan palabras para agradecerte el apoyo y la fuerza que me has ido transmitiendo día a día, mes a mes, durante estos 6 magníficos años juntos. Sabes que sin ti, este esfuerzo y sacrificio quizás no hubiera sido el mismo. Acabo una etapa muy importante en mi vida y me enorgullece enormemente poder disfrutarla contigo, pero recuerda, lo mejor está por llegar; te quiero.

RESUMEN

Debido al progresivo envejecimiento de la población mundial y a la mayor prevalencia de los factores de riesgo asociados a enfermedades musculoesqueléticas, como la artrosis (OA) o la osteoporosis (OP), todos los pronósticos vaticinan una creciente incidencia de estas patologías en los próximos años.

La OA es una enfermedad crónica multifactorial que afecta a todas las estructuras anatómicas articulares y en particular al conjunto cartílago-hueso subcondral. Aunque la OA ha sido considerada en sus inicios como un trastorno del cartílago, la integridad del cartílago articular parece depender de las propiedades mecánicas del hueso subyacente. En la actualidad no se conoce una terapia farmacológica eficaz y se tiende a dar mayor interés a posibles tratamientos no farmacológicos como la actividad física moderada, corrección postural y mejora biomecánica de la articulación.

En el presente trabajo se demuestran los beneficios de la manipulación quiropráctica (MQ) mediante el dispositivo ActivatorV®. Los efectos de esta terapia física se ven reflejados en las diferencias que se encuentran a nivel de la densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) en el hueso cortical subcondral y los cambios en la micro-arquitectura ósea del hueso trabecular subcondral estudiado por microtomografía computarizada (microCT). Además, se demuestra el efecto de la MQ en la expresión del sistema del ligando del receptor activador de NFκB (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) tanto en el hueso subcondral como en el cartílago de los conejos con OA. Asociada a esta mejora fisiopatológica, la MQ reduce la sinovitis desarrollada en la OA, disminuyendo la inflamación y la neovascularización, así como el infiltrado inflamatorio. Finalmente y de forma muy preliminar, se ha encontrado un potencial efecto modulador de la MQ sobre el dolor, a través del estudio de dos neurotrofinas importantes en el remodelado óseo y la inervación aferente de tejidos dañados, Semaforina 3A (Sema 3A) y Netrina-1.

Por otro lado, desde hace décadas, se ha descrito que tanto la osteopenia como las fracturas son comorbilidades comunes asociadas a múltiples enfermedades, entre las que destaca la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Tenofovir, un antirretroviral ampliamente utilizado en el tratamiento del VIH, conduce a un aumento de la expresión de marcadores de catabolismo óseo y disminución de la DMO en estos pacientes. El efecto de este fármaco en la célula produce la inhibición de la liberación de ATP (al inhibir panexina-1) y disminuye los niveles de adenosina extracelulares. Por su parte, dipiridamol, un

fármaco que bloquea el transporte de adenosina al interior celular, activa de forma indirecta el receptor A_{2A} de adenosina ($A_{2A}R$) y produciendo la inhibición de la formación de osteoclastos y estimulando la formación de hueso.

En esta tesis doctoral se ha demostrado que el tratamiento con tenofovir provoca un aumento dependiente de la dosis en la diferenciación de osteoclastos *in vitro* que es revertido por dipiridamol, un compuesto que bloquea la entrada a la célula de adenosina incrementado su concentración extracelular; modulándose la expresión de catepsina K, RANKL y OPG. Además, tenofovir es capaz de aumentar la expresión de ARNm para catepsina K y NFATc1, siendo igualmente revertido este efecto por dipiridamol. Estos efectos se ven regulados a través de la fosforilación de ERK 1/2 y P38 y la translocación al núcleo de NFkB. Por otro lado, tenofovir inhibe la diferenciación de los osteoblastos *in vitro* por un mecanismo dependiente de la translocación al núcleo de β -catenina. De forma paralela, mediante análisis por microCT, se ha comprobó que ratones *wild type* tratados con tenofovir (tanto macho como hembras ovariectomizadas) tienen una DMO disminuida y una alteración de hueso trabecular, siendo revertido por el tratamiento con dipiridamol. Se obtuvieron resultados similares en los estudios histológicos para los marcadores de remodelado óseo. También se demostró que el efecto de dipiridamol en la reversión de tenofovir es dependiente de $A_{2A}R$, ya que en los ratones *knockeados* para el gen de $A_{2A}R$, dipiridamol no mostró cambios en los parámetros de microCT y tampoco a nivel histológico.

Finalmente, el estudio en pacientes *naïve* VIH positivos de los principales marcadores de remodelado óseo, ha demostrado que el tratamiento con tenofovir tiene una acción catabólica en el hueso, siendo mucho más evidente que con otros tratamientos antirretrovirales que no contienen tenofovir en su formulación.

ABSTRACT

Due to progressive aging of the population and the higher prevalence of risk factors associated with musculoskeletal diseases, such as osteoarthritis (OA) or osteoporosis (OP), an increasing incidence of these pathologies in the coming years is predicted.

OA is a multifactorial chronic disease that affects all articular anatomical structures, and in particular the subchondral bone-cartilage set. Although OA has been considered at the beginning as a cartilage disorder, the integrity of the articular cartilage seems to be dependent on the mechanical properties of the underlying bone. At present, no effective pharmacological therapies are known, and there is a tendency to give greater interest to possible non-pharmacological treatments such as moderate physical activity, postural correction and biomechanical improvement of the joint.

In the present work we demonstrate the benefits of chiropractic manipulation (MQ) through the Activator® device. Computerized microtomography (microCT) has demonstrated the effects of this physical therapy in our OA rabbit model, as MQ exerts differences at the level of bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) in the subchondral cortical and subchondral trabecular bone. In addition, modulation of the expression of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) is found in subchondral bone and cartilage in OA, and MQ prevents the resorptive action of the disease. This pathophysiological improvement associated with MQ, in turn, prevents OA synovitis, inflammation and neovascularization. Finally and very preliminarily, we have demonstrated the modulatory effect MQ in pain, through the study of Semaphorin 3A (Sema 3A) and Netrin-1, two neurotrophins important in bone remodeling and afferent innervations of damaged tissues.

On the other hand, for years, it has been described that both osteopenia and fractures are common comorbidities and multiple diseases, among which is the infection by the human immunodeficiency virus (HIV). Usual long-term therapies administered to prevent loss of bone have not been demonstrated to have effect in these individuals such as denosumab. Tenofovir, an antiretroviral used in the treatment of HIV, leads to an increase in the expression of markers of bone catabolism and a decrease in BMD in these patients. Tenofovir is an AMP analog that inhibits HIV retrotranscriptase, but also in cells it exerts its effect by inhibition of ATP release through pannexin-1 transporter blockade and reduces extracellular ATP and adenosine levels. Moreover, it has been described that indirect activation of adenosine A_{2A}

receptor ($A_{2A}R$) by dipyridamole, an agent that block adenosine cell uptake, inhibits osteoclast formation and function and promotes bone formation.

In this thesis it has been shown that treatment with tenofovir causes a dose response increase in osteoclast differentiation *in vitro* that is reversed by dipyridamole, a compound that blocks adenosine uptake by cells and therefore increases extracellular adenosine levels; regulating the expression of cathepsin K, RANKL and OPG. In addition, cathepsin K and NFATc1 mRNA levels are increased in the presence of tenofovir, being similarly reversed by dipyridamole. These tenofovir effects are regulated by phosphorylation of MAPK (ERK1/2 and p38) and the nuclear translocation of NF κ B. On the other hand, tenofovir inhibits osteoblast differentiation *in vitro* by inhibition of β -catenin signaling. Moreover, it has been seen *in vivo* that when mice (both male and OVX female) are treated with tenofovir, there is a profound decrease in weight, BMD and alterations in trabecular bone shown by DXA and microCT analysis. Similar results are observed in histological studies for cathepsin K, RANKL and CD68. Dipyridamole is able to revert these deleterious effects in a mechanism depending on $A_{2A}R$, as mice lacking $A_{2A}R$ ($A_{2A}R$ KO) did not show the ability to revert tenofovir effects.

Finally, the study of the main bone remodeling markers in naïve HIV positive patients, has shown that treatment with tenofovir has an early catabolic action in bone (among the first year of treatment), being much more evident than other antiretroviral treatments that do not contain tenofovir in its formulation.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	43
1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.	43
1.1. Fisiopatología y etiología de la enfermedad de artrosis.	43
1.1.1. Cartílago articular.	44
1.1.2. Hueso subcondral.	46
1.1.2.1. Sistema RANKL/OPG.	47
1.1.3. Membrana sinovial.	48
1.2. Estudios científicos en modelos animales de artrosis.	48
1.3. Intervenciones no farmacológicas en el manejo de la OA. Terapias basadas en las ondas de choque como posible terapia para la enfermedad.	50
2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.	53
2.1. Infección por VIH: etiología, epidemiología y comorbilidades del virus.	53
2.2. Terapia antirretroviral: tratamiento de primera línea con tenofovir.	54
2.3. Importancia de panexina-1 en la infección por VIH.	56
2.4. Transportadores de adenosina y su bloqueo mediado por dipiridamol.	58
2.5. Receptores purinérgicos de adenosina.	59
2.5.1. Receptor A _{2A} de adenosina y su implicación en la osteoclastogénesis.	61
2.5.2. Receptor A _{2A} de adenosina y su implicación en la osteoblastogénesis.	61
OBJETIVOS	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.	69
1.1. Material y reactivos.	69
1.2. Animales.	70
1.3. Modelo Experimental de artrosis en conejos.	71
1.3.1. Análisis de la micro-arquitectura estructural del hueso mediante microtomografía computarizada (microCT).	72
1.3.2. Estudio histológico de marcadores de remodelado óseo en tibias de conejos sanos y artrósicos (verdadera y falsa manipulación).	73
1.3.3. Evaluación del daño en el cartílago de fémur y tibia en conejos artrósicos y sanos.	74
1.3.4. Evaluación del daño en la membrana sinovial de los conejos artrósicos y sanos.	74
1.3.5. Estudio inmunohistológico de detección de células inflamatorias y neo-vascularización en la sinovial de los conejos en estudio.	75
1.3.6. Análisis de expresión proteica de marcadores de inflamación y fibrotización en membrana sinovial de conejos sanos y artrósicos (manipulados y no manipulados).	76
1.3.7. Análisis de expresión proteica de neurotrofinas tras la manipulación quiropráctica en las articulaciones de conejos artrósicos.	76
1.3.8. Análisis de expresión génica de Sema 3A tras la manipulación quiropráctica en las articulaciones de conejos artrósicos.	77
1.4. Análisis estadístico.	78
2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.	79
2.1. Material y reactivos.	79
2.2. Estudios <i>in vitro</i> en osteoclastos.	81
2.2.1. Diferenciación de osteoclastos en cultivo.	81
2.2.2. Determinación de los niveles extracelulares de ATP en el sobrenadante de osteoclastos tras el tratamiento con tenofovir.	81
2.2.3. Estudio <i>knockdown</i> de transportadores de ATP y receptor A _{2A} de adenosina <i>in vitro</i> .	82

2.2.4. Estudio de expresión génica de marcadores de remodelado óseo en osteoclastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol mediante RT-PCR cuantitativa.	83
2.2.5. Estudio de las rutas de activación de MAPKs y NFκB en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol en osteoclastos murinos.	84
2.3. Estudios <i>in vitro</i> en osteoblastos.	85
2.3.1. Diferenciación de osteoblastos.	85
2.3.2. Estudio de expresión génica de marcadores de remodelado óseo en osteoblastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol mediante RT-PCR cuantitativa.	85
2.3.3. Estudio de la activación de β-catenina en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol en osteoblastos murinos.	86
2.3.4. Estudio de translocación al núcleo de β-catenina en osteoblastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol.	86
2.4. Experimentos <i>in vivo</i> .	87
2.4.1. Determinación de la dosis de tenofovir en el modelo animal murino.	87
2.4.2. Modelo animal en ratones macho C57Bl/6 <i>wild type</i> y A _{2A} KO.	87
2.4.3. Modelo animal en ratonas C57Bl/6 <i>wild type</i> y A _{2A} KO ovariectomizadas (OVX).	88
2.4.4. Análisis de densidad mineral ósea (DMO) en ratones mediante densitometría (DEXA).	89
2.4.5. Análisis de la micro-arquitectura estructural del hueso mediante microtomografía computarizada (microCT).	89
2.4.6. Estudio histológico de marcadores de remodelado óseo en los huesos largos de ratones.	90
2.4.7. Evaluación de la fosfatemia y del grosor del osteoide en los ratones <i>wild type</i> .	91
2.5. Estudio prospectivo en pacientes con VIH.	92
2.5.1. Diseño del estudio, criterios de inclusión y aspectos éticos.	92
2.5.2. Análisis y parámetros de estudio en la cohorte de pacientes.	92
2.5.3. Medida de marcadores de remodelado óseo en el plasma de pacientes VIH: basal, 3 y 12 meses.	93
2.5.4. Medida de citoquinas pro y anti-inflamatorias en el plasma de pacientes VIH: basal, 3 y 12 meses.	93
2.5.5. Análisis estadístico.	94

RESULTADOS	97
1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.	97
1.1. Resultados <i>in vivo</i> .	97
1.1.1. El estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica (MQ) en la articulación, mejora la pérdida de hueso cortical subcondral relacionada con la artrosis en conejos.	97
1.1.2. La MQ mejora el componente trabecular subcondral en la tibia de los conejos artrósicos.	100
1.1.3. Cambios en la modulación del remodelado óseo subcondral en las tibias de conejos artrósicos tras la MQ.	102
1.1.4. Mejora del daño en el tejido cartilaginoso en las articulaciones de los conejos artrósicos tras la estimulación mecánica inducida por ActivatorV®.	106
1.1.5. La MQ logra mejorar la sinovitis en las articulaciones de los conejos artrósicos.	108
1.1.6. Estudio de la expresión de marcadores de inflamación en membranas sinoviales de conejos artrósicos sometidos a una falsa o verdadera MQ.	110
1.1.7. Análisis del infiltrado macrofágico en las sinoviales de conejos artrósicos con falsa o verdadera manipulación utilizando el ActivatorV®.	112
1.1.8. El estímulo mecánico inducido por la MQ modula la angiogénesis en la membrana sinovial durante la artrosis.	113
1.1.9. El estímulo mecánico inducido por la MQ reduce la fibrotización de la matriz estromal en membrana sinovial.	114
1.1.10. Cambios en la expresión de neurotrofinas tras la manipulación mecánica en las articulaciones de conejos artrósicos.	115
2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.	118
2.1. Resultados <i>in vitro</i> .	118
2.1.1. Tenofovir modula la diferenciación de osteoclastos a través de un mecanismo dependiente del transporte de ATP y adenosina.	118

2.1.2. Tenofovir estimula la diferenciación de osteoclastos, a través de la activación de MAPKs y la translocación al núcleo de NFκB y el pre-tratamiento con dipiridamol revierte el efecto.	122
2.1.3. Tenofovir promueve la fosforilación de ERK1/2 y p38, así como la translocación al núcleo de NFκB durante la diferenciación de osteoclastos pre-tratados con tenofovir; no viéndose revertido tal efecto con dipiridamol.	124
2.1.4. Tenofovir inhibe la diferenciación de osteoblastos <i>in vitro</i> y su efecto es revertido por dipiridamol.	126
2.2. Resultados <i>in vivo</i> .	130
2.2.1. El tratamiento con tenofovir indujo la pérdida de peso y grasa corporal, disminución de la DMO y alteración de la micro-arquitectura ósea en ratones macho <i>wild type</i> , sin verse cambios en los congéneres A _{2A} KO.	130
2.2.2. Tenofovir produjo el aumento de expresión de marcadores de resorción ósea <i>in vivo</i> a nivel histológico en ratones macho <i>wild type</i> , viéndose revertido esta acción por dipiridamol. No se vieron cambios histológicos en el modelo A _{2A} KO.	135
2.2.3. El tratamiento con tenofovir indujo la pérdida de peso y grasa corporal, disminución de la DMO y alteración de la micro-arquitectura ósea en ratonas OVX <i>wild type</i> , sin verse cambios en los congéneres A _{2A} KO.	139
2.2.4. Tenofovir produjo el aumento de expresión de marcadores de resorción ósea <i>in vivo</i> a nivel histológico en ratonas OVX <i>wild type</i> , viéndose revertido esta acción por dipiridamol. No se vieron cambios histológicos en el modelo A _{2A} KO.	145
2.2.5. El tratamiento con tenofovir no indujo osteomalacia ni cambios en el grosor del osteoide en los modelos murinos <i>wild type</i> macho y hembra.	149
2.3. Resultados <i>in vivo</i> en pacientes VIH.	150
2.3.1. Características epidemiológicas y socio-demográficas de los pacientes con VIH en estudio.	150
2.3.2. Cambios en los marcadores de remodelado óseo de los pacientes con VIH tratados con tenofovir (TDF y TAF).	151

2.3.3. Cambios en el perfil inflamatorio de los pacientes con VIH tratados con tenofovir (TDF y TAF).	154
DISCUSIÓN	159
1. Impacto de la manipulación quiropráctica en la prevención de la artrosis en un modelo animal de conejo.	159
1.1. La MQ con ActivatorV® modula el remodelado del hueso cortical subcondral y hueso trabecular subcondral en la tibia de los conejos artrósicos.	159
1.2. El estímulo mecánico aplicado con ActivatorV® reduce las lesiones en el cartílago generadas durante la artrosis.	162
1.3. Regulación de la sinovitis y la inflamación a través del estímulo mecánico producido por la MQ.	163
1.4. Efecto de la MQ en la expresión de Sema 3A en membrana sinovial. Potencial implicación en la modulación del dolor en conejos artrósicos.	165
2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.	167
2.1. Tenofovir es capaz de modular la diferenciación y función de los osteoclastos <i>in vitro</i> , viéndose revertido su efecto por el tratamiento con dipiridamol.	167
2.2. Tenofovir es capaz de modular la diferenciación y función de los osteoblastos <i>in vitro</i> , viéndose revertido su efecto por el tratamiento con dipiridamol.	169
2.3. Efectos de tenofovir <i>in vivo</i> en ratones sanos y osteoporóticos, tanto <i>wild type</i> como deficientes del A _{2A} R.	170
2.4. La terapia antirretroviral de primera línea con tenofovir induce un estado catabólico óseo derivando en osteopenia y osteoporosis en pacientes con VIH.	172
CONCLUSIONES	177
REFERENCIAS	181
APÉNDICE	205

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Esquema representativo de las alteraciones patológicas y los cambios anatómicos producidos por la OA en la articulación.

Figura 2: Representación de los efectos de la carga biomecánica en el metabolismo del cartílago.

Figura 3: Forma típica de una onda de choque.

Figura 4: Instrumento ActivatorV® utilizado en la manipulación quiropráctica.

Figura 5: Estructura molecular del fármaco tenofovir en sus dos versiones comerciales actuales: TDF y la más reciente y mejorada TAF.

Figura 6: Representación esquemática de los tres miembros de la familia panexina.

Figura 7: Mecanismo de acción de tenofovir en la célula.

Figura 8: Efecto de dipiridamol en la regulación purinérgica y el aumento de la adenosina extracelular.

Figura 9: Esquema que muestra la síntesis y degradación de adenosina y sus receptores en la célula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 10: Manipulación quiropráctica realizada con ActivatorV® en conejos artrósicos.

Figura 11: Cronograma del modelo de OA en conejo y de la manipulación quiropráctica realizada.

Figura 12: Cronograma del modelo animal murino C57Bl/6 macho C57Bl/6 *WT* y A2AKO.

Figura 13: Cronograma del modelo animal murino C57Bl/6 hembra (OVX) *WT* y A2AKO.

RESULTADOS

Figura 14: Representación gráfica de la evolución de los pesos de los conejos a lo largo del modelo.

Figura 15: Imágenes representativas del estudio realizado por microCT en hueso cortical subcondral de la placa tibial completa.

Figura 16: Imágenes representativas del estudio realizado por microCT en hueso cortical subcondral en placa tibial externa e interna.

Figura 17: Parámetros analizados en hueso trabecular subcondral mediante microCT.

Figura 18: Análisis por inmunohistoquímica del sistema RANKL/OPG en hueso subcondral y cartílago.

Figura 19: Estudio de diferenciación y actividad osteoclástica en hueso subcondral.

Figura 20: Análisis por inmunohistoquímica de fosfatasa alcalina (FA) en hueso subcondral.

Figura 21: Estudio macroscópico del daño en el cartílago femoral de los conejos en estudio.

Figura 22: Evaluación del daño producido por la OA en el cartílago de la tibia de los conejos en estudio.

Figura 23: Evaluación del daño producido por la OA en el cartílago de la tibia de los conejos en estudio.

Figura 24: Expresión proteica de COX-2, TNF- α e IL1- β inactiva y activa en membranas sinoviales de cada uno de los grupos experimentales estudiados.

Figura 25: Evaluación del infiltrado celular macrófagico en membrana sinovial.

Figura 26: Valoración de la angiogénesis en membrana sinovial.

Figura 27: Expresión proteica de MMP-3 y COL VI en las membranas sinoviales de cada uno de los grupos experimentales estudiados.

Figura 28: Estudio de expresión de las neurotrofinas Sema 3A y Netrina-1 en membrana sinovial.

Figura 29: Tenofovir potencia la diferenciación de los osteoclastos *in vitro* y su efecto es revertido por el dipiridamol.

Figura 30: Tenofovir potencia la diferenciación de células RAW 264.7 *in vitro* en un mecanismo relacionado con el transporte de ATP por panexina-1 y conexina-43, siendo revertido el efecto por dipiridamol.

Figura 31: El pre-tratamiento con dipiridamol revierte la fosforilación de ERK1/2 y p38 inducida por tenofovir durante la diferenciación de los osteoclastos.

Figura 32: El pre-tratamiento con dipiridamol revierte la translocación nuclear de NF κ B inducida por tenofovir durante la diferenciación de los osteoclastos.

Figura 33: El pre-tratamiento previo con tenofovir activa la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK durante la diferenciación de osteoclastos; no pudiendo revertir dipiridamol este efecto.

Figura 34: El pre-tratamiento previo con tenofovir activa la translocación nuclear de NF κ B durante la diferenciación de los osteoclastos, sin ser revertida por el tratamiento con dipiridamol.

Figura 35: Tenofovir induce la pérdida de diferenciación de osteoblastos a través de un mecanismo relacionado con el transporte de ATP; siendo tal efecto revertido por dipiridamol.

Figura 36: Expresión proteica de β -catenina en osteoblastos murinos tratados con tenofovir y dipiridamol.

Figura 37: Translocación al núcleo de β -catenina durante la diferenciación de los osteoblastos, tratados con tenofovir y dipiridamol.

Figura 38: Tenofovir induce la pérdida de peso, disminuye la DMO y promueve la reducción de la grasa corporal en ratones macho *wild type*.

Figura 39: Los ratones macho $A_{2A}KO$ no presentaron cambios en su peso, así como tampoco en el contenido mineral óseo y densidad mineral ósea.

Figura 40: Cambios en la microarquitectura ósea producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratones macho *wild type* y $A_{2A}KO$.

Figura 41: Cambios en el remodelado óseo producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratones macho *wild type* y $A_{2A}KO$.

Figura 42: Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratones *wild type* macho.

Figura 43: Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratones macho $A_{2A}KO$.

Figura 44: Tenofovir indujo la pérdida de peso, disminuyó la DMO y promovió la reducción de la grasa corporal en ratonas OVX *wild type*, sin verse revertido tal efecto por dipiridamol.

Figura 45: Las ratonas OVX $A_{2A}KO$ no presentaron cambios significativos en su peso, así como en el contenido mineral óseo y densidad mineral ósea.

Figura 46: Cambios en la microarquitectura ósea producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratonas OVX *wild type* y $A_{2A}KO$.

Figura 47: Cambios en el remodelado óseo producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratonas OVX *wild type* y $A_{2A}KO$.

Figura 48: Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratonas OVX *wild type*.

Figura 49: Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratonas OVX $A_{2A}KO$.

Figura 50: Medidas de fósforo sérico en suero.

Figura 51: Medida del grosor del osteoide en cortes de huesos largos de ratones macho *wild type*.

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Clasificación de los transportadores CNT y ENT, y sus principales sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2: Secuencias de *primers* SYBR Green® usadas en los estudios de expresión génica de Sema 3A en las membranas sinoviales de los conejos en estudio.

Tabla 3: Secuencias de *primers* SYBR Green® usadas en los estudios de expresión de marcadores óseos.

RESULTADOS

Tabla 4: Cambios en los parámetros del hueso cortical subcondral en tibia proximal, medidos por microCT.

Tabla 5: Cambios en los parámetros del hueso cortical subcondral en tibia proximal, medidos independientemente en ambas placas tibiales externa e interna por microCT.

Tabla 6: Cambios en los parámetros del hueso trabecular subcondral en una región de interés (ROI) de tibia proximal medida por microCT.

Tabla 7: Resultados del análisis por microCT de fémures de ratones macho *wild type* tratados con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos.

Tabla 8: Resultados del análisis por microCT de fémures de ratones macho A_{2A}KO tratados con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos.

Tabla 9: Resultados del análisis por microCT de fémures de ratonas OVX *wild type* tratadas con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos.

Tabla 10: Resultados del análisis por microCT de fémures de ratonas OVX A_{2A}KO tratadas con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos.

Tabla 11: Datos basales, 3 meses y 12 meses posteriores al tratamiento para marcadores óseos medidos mediante ELISA multiplex con tecnología LUMINEX MAGPIX®.

Tabla 12: Datos basales, 3 meses y 12 meses posteriores al tratamiento para los niveles plasmáticos de citoquinas pro y antiinflamatorias, medidas mediante ELISA multiplex con tecnología LUMINEX MAGPIX®.

LISTADO DE ABREVIATURAS

A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R y A₃R: Receptores de adenosina- 1, -2A, -2B y -3.

AB Complex: Complejo enzimático de avidina biotinilada.

AC: Adenilato ciclasa.

ADAMTS-5: Desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina tipo 5.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AG: Agrecano.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP.

AR: Artritis Reumatoide.

ARN: Ácido ribonucleico.

ASB: Albúmina de suero bovino.

ATP: Adenosín trifosfato.

BMC: *Bone Marrow Cells* (Células de médula ósea murina).

BMP-2: Proteína morfogénica tipo 2.

BV/TV: Índice volumen óseo/volumen tisular.

CCR5: C-C quimioquina receptora de tipo 5.

COL II: Colágeno tipo 2.

COL IV: Colágeno tipo 4.

COL X: Colágeno tipo 10.

COL VI: Colágeno tipo 6.

COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2.

Ct.Th: Grosor de la parte cortical del hueso.

CTX: Telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo 1.

CXCR4: C-X-C quimioquina receptora de tipo 4.

DAG: Diacilglicerol.

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DEXA: Densitometría por absorciometría de rayos X.

DKK1: Dickkopf-1, regulador negativo de la vía de señalización Wnt.

DMO: Densidad mineral ósea.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DPX: Di-N-Butilftalato xileno.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EEM: Error estándar de la media.

ENT1/ENT2: Transportador equilibrador de nucleósidos tipo 1 y 2.

EPAC: Proteína de intercambio activada por AMPc.

ERK 1/2: Quinasa tipo 1 y 2 reguladas por señales extracelulares.

ESWT: *Extracorporeal Shockwave Therapy* (Terapia por ondas de choque extracorpóreas).

FA: Fosfatasa alcalina.

FAK: Quinasa de adhesión focal.

FGF-23: Factor de crecimiento fibroblástico tipo 23.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

HRP: Peroxidasa de rábano.

Ig: Inmunoglobulina.

I κ B α : Inhibidor de NF- κ B α .

IL: Interleuquina.

IMC: Índice de masa corporal.

INF γ : Interferón gamma.

IP3: Inositol trifosfato.

ITIN/t: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido/nucleótido.

ITINN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido/nucleótido.

J: julio, unidad del Sistema Internacional para energía, trabajo y calor.

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal.

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MC3T3: Línea celular de osteoblastos murinos.

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

MEC: Matriz extracelular.

microCT: Microtomografía computarizada.

MMP: Metaloproteínasa.

MMP3: Metaloproteínasa tipo 3.

MMP13: Metaloproteínasa tipo 13.

MQ: Manipulación quiropráctica.

NaCl: Cloruro sódico.

NFATc1: Factor nuclear de células T tipo 1 activadas.

NF- κ B α : Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NMDG: N- Metil-D-glucosamina.

OA: Osteoartritis, artrosis.

OAT-1: Transportador de aniones orgánicos tipo 1.

OAT-3: Transportador de aniones orgánicos tipo 3.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OP: Osteoporosis.

OPG: Osteoprotegerina.

OVX: Ovariectomía.

P1NP: Propéptido amino terminal del procolágeno tipo 1.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pERK: Quinasa tipo 1 y 2 reguladas por señales extracelulares fosforilada.

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa.

PIkB α : Inhibidor de NF-kB α fosforilado.

pJNK: Quinasa c-Jun N-terminal fosforilada.

PKA: Proteína quinasa A.

PK3: Proteína quinasa 3.

PKC: Proteína quinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PTH: Hormona paratiroidea.

RAM-11: *Rabbit Alveolar Macrophages* 11 (Marcadores de macrófagos alveolares tipo 11).

RANK: receptor activador de NF κ B.

RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B.

RAW 264.7: Línea celular de monocitos/macrófagos murinos.

RhoA: Proteína de la familia homologa a Ras, miembro A.

RIPA: Tampón de lisis celular para extracción de proteínas.

Rock-1: Proteína Rho asociado a bobina enrollada que contiene proteína quinasa tipo 1.

SBF: Suero bovino fetal.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

Sema 3A: Semaforina tipo 3A.

Ser 33/37: Serina en posición 33 y 37.

ShRNA: Ácido ribonucleico de horquilla corta.

SOST: Esclerostina.

TAF: Tenofovir Alafenamida.

Tb.N: Número de trabéculas.

Tb.S: Espaciado trabecular.

Tb.Th: Grosor trabecular.

TBS: Tampón salino de Tris-HCl.

TDF: Tenofovir Disoproxil Fumarato.

Thr 41: Treonina en posición 41.

TLR: Receptor tipo toll.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo α .

TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato.

Tris-HCl: trisaminometano-ácido clorhídrico.

VEGF-164: Factor de crecimiento endotelio vascular tipo 164.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

WT: *wild type*, genotipo "salvaje".

α -MEM: Medio de cultivo de composición esencial mínima.

σ : Desviación estándar.

INTRODUCCIÓN

PREFACIO

Debido al envejecimiento progresivo de la población mundial y a la mayor prevalencia de factores de riesgo asociados a las enfermedades musculoesqueléticas (edad, obesidad, factores hormonales y metabólicos y predisposición genética) todos los pronósticos auguran una creciente incidencia de patologías óseas y musculares en los próximos años, en especial la artrosis (OA) y la osteoporosis (OP) [1-4].

Como agravante, hasta la fecha, no existen tratamientos farmacológicos aprobados que reviertan o detengan la progresión de la OA, por lo que el único tratamiento disponible para los pacientes se limita a la administración de analgésicos y en última instancia, para casos graves, el reemplazo total de la articulación por una prótesis.

Además, no sólo el propio envejecimiento de la población y la sobrecarga mecánica predisponen a sufrir enfermedades musculoesqueléticas; sino que se ha comprobado durante los últimos años que importantes alteraciones óseas cursan como comorbilidades de otras enfermedades, destacando la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [5].

Por lo tanto, ante esta situación, y teniendo en cuenta las escasas opciones terapéuticas para la OA y la ausencia de respuesta a la terapia farmacológica en la OP asociada a la infección del VIH; esta tesis doctoral se plantea con el objetivo de investigar, de forma paralela e independiente, posibles terapias eficaces no farmacológicas y farmacológicas para prevenir y revertir los efectos deletéreos óseos de estas dos enfermedades reumáticas.

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.

1.1. Fisiopatología y etiología de la enfermedad de artrosis.

La OA es la enfermedad reumatológica más común e incidente, caracterizada por cambios crónicos estructurales y mecánicos en las articulaciones [2-4, 6]. La patología actúa limitando en gran medida la movilidad articular y generando dolor en los pacientes [6]. Los cambios patológicos observados en las articulaciones de los pacientes con OA incluyen degradación del cartílago articular, engrosamiento del hueso subcondral, formación de osteofitos, grados variables de inflamación sinovial, degeneración de los ligamentos e hipertrofia de la cápsula articular [6]. También puede haber cambios en los músculos periarticulares, los nervios y meniscos que pueden contribuir a la OA o los propios síntomas de la enfermedad [6].

La OA afecta aproximadamente al 15% de la población comprendida entre los 25 y 75 años de edad [7]. La prevalencia de la OA aumenta con la edad, viéndose afectada hasta el 70% de la población mayor de 65 años [8]. Numerosas anomalías articulares y enfermedades sistémicas están asociadas con la OA, incluida la displasia articular y diversas enfermedades genéticas y metabólicas. Sin embargo, entre los factores de riesgo para la OA, destacan como más importantes: la edad, la obesidad, las lesiones articulares y las influencias ambientales, en particular la sobrecarga repetitiva y factores biomecánicos [9].

La enfermedad se desarrolla y progresa con cambios degenerativos progresivos en la estructura, composición y también en las propiedades mecánicas de diferentes tejidos articulares como el cartílago, hueso subcondral y trabecular; y los tejidos sinoviales y otros tejidos adyacentes [8, 10] (Fig. 1). A continuación, se resume la función de los distintos tejidos articulares y su afectación durante la OA.

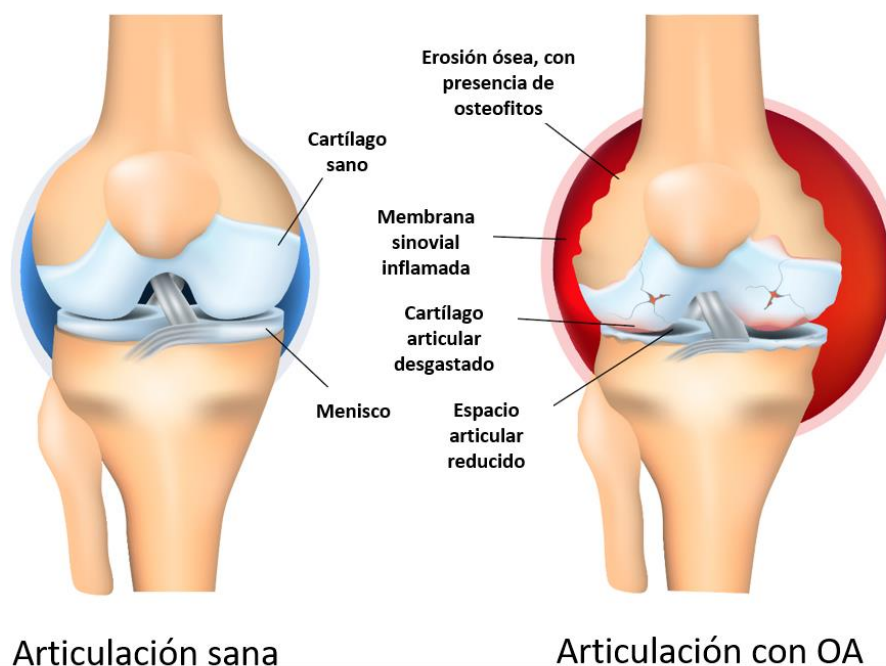


Figura 1. Esquema representativo de las alteraciones patológicas y los cambios anatómicos producidos por la OA en la articulación. (Modificada de *Genetics Home Reference; U.S. National Library of Medicine, 2019*).

1.1.1. Cartílago articular.

El cartílago articular es el tejido responsable de la fricción y amortiguación del impacto generado durante el movimiento y la actividad física. Se caracteriza por ser un tejido avascular y aneural, además de no poseer drenaje linfático. Está formado por un sólo tipo celular (condrocito) y una matriz extracelular estructurada y constituida por colágenos, proteoglicanos y agua [11].

En el cartílago sano, los condrocitos sintetizan y degradan continuamente los componentes de la matriz extracelular renovando el tejido como respuesta a distintos estímulos mecánicos, factores de crecimiento o interleuquinas [12]. Durante la OA, el cartílago desarrolla un desequilibrio entre la degradación y formación; activándose los condrocitos quiescentes y produciendo proteínas tanto catabólicas como anabólicas [12]. Debido a la incapacidad de estas células de regenerar la matriz extracelular, el cartílago va perdiendo sus propiedades físicas elásticas y de resistencia a la compresión [12]. La degradación de la matriz extracelular se produce a través de proteasas como las desintegrinas y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 5 (ADAMTS-5) que degradan agregano (AG) y otros proteoglicanos que protegen y estructuran la red de colágenos que constituyen la matriz [13]. La acción de las

ADAMTS-5 facilita la activación de metaloproteinasas como la metaloproteinasa tipo 13 (MMP-13) y la metaloproteinasa tipo 3 (MMP-3), con una gran afinidad por el colágeno tipo II (COL II) [13]. Como consecuencia de la acción de estas proteínas aparecen en el cartílago lesiones y erosiones que exponen el hueso subcondral adyacente a la fricción articular.

En cuanto al componente celular y en condiciones fisiológicas normales, los condrocitos, de pequeño tamaño, se encuentran en una fase de reposo, tienen una tasa de proliferación baja y se distribuyen uniformemente en la matriz [14, 15]. Cuando los condrocitos se van estimulando por la actividad física normal de la articulación, entran en una fase proliferativa donde adquieren una conformación aplanada, se organizan en columnas y secretan entre otras proteínas colágeno tipo IV (COL IV) y matrilina [16]. A continuación, conforme aumenta la presión mecánica externa y los estímulos biomecánicos, estas células entran en la fase de diferenciación hipertrófica [16]. Como resultado se forma un entramado de colágeno tipo X (COL X), principalmente, que servirá de referencia para la posterior calcificación del tejido [17]. Estos condrocitos hipertróficos calcifican la matriz extracelular que es invadida por vasos sanguíneos, y mueren por apoptosis, siendo reemplazados por osteoclastos y precursores de osteoblastos que formarán el centro de osificación que reemplazará cartílago por hueso [18].

En este sentido, varios investigadores han descrito que el estrés mecánico de la articulación es un factor muy importante que regula el metabolismo y la composición del cartílago y también del hueso [19-22]. Además, se ha comprobado que existe una importante relación entre el estrés mecánico y la regulación de las citoquinas y mediadores inflamatorios que alteran la homeostasis y el metabolismo del cartílago normal sano [23, 24]. La carga mecánica del cartílago estimula el metabolismo de los condrocitos e induce la biosíntesis de factores anabólicos para preservar la integridad del tejido [25, 26] (Fig. 2 A-B). Las señales mecánicas pueden modular la actividad bioquímica y los cambios en el comportamiento celular a través de la transducción mecánica. La compresión del cartílago conduce a cambios complejos dentro del tejido, incluidos la matriz y el componente celular pudiendo provocar la deformación, cambios de presión hidrostática y osmótica, alteración del flujo y contenido de agua de la matriz, cambios en la concentración de iones y de la densidad de carga [25, 27-29]. Estos cambios son detectados por los mecano-receptores de la superficie celular, incluyendo los canales iónicos e integrinas mecano-sensibles. La activación de estos mecano-receptores inicia cascadas de señalización intracelular, desencadenando procesos de remodelación de tejidos. Sin embargo, cuando la carga mecánica es excesiva, se produce un desequilibrio

cuantitativo entre la actividad anabólica y catabólica que resulta en el agotamiento de los componentes de la matriz [25, 27-29] (Fig. 2 A-B).

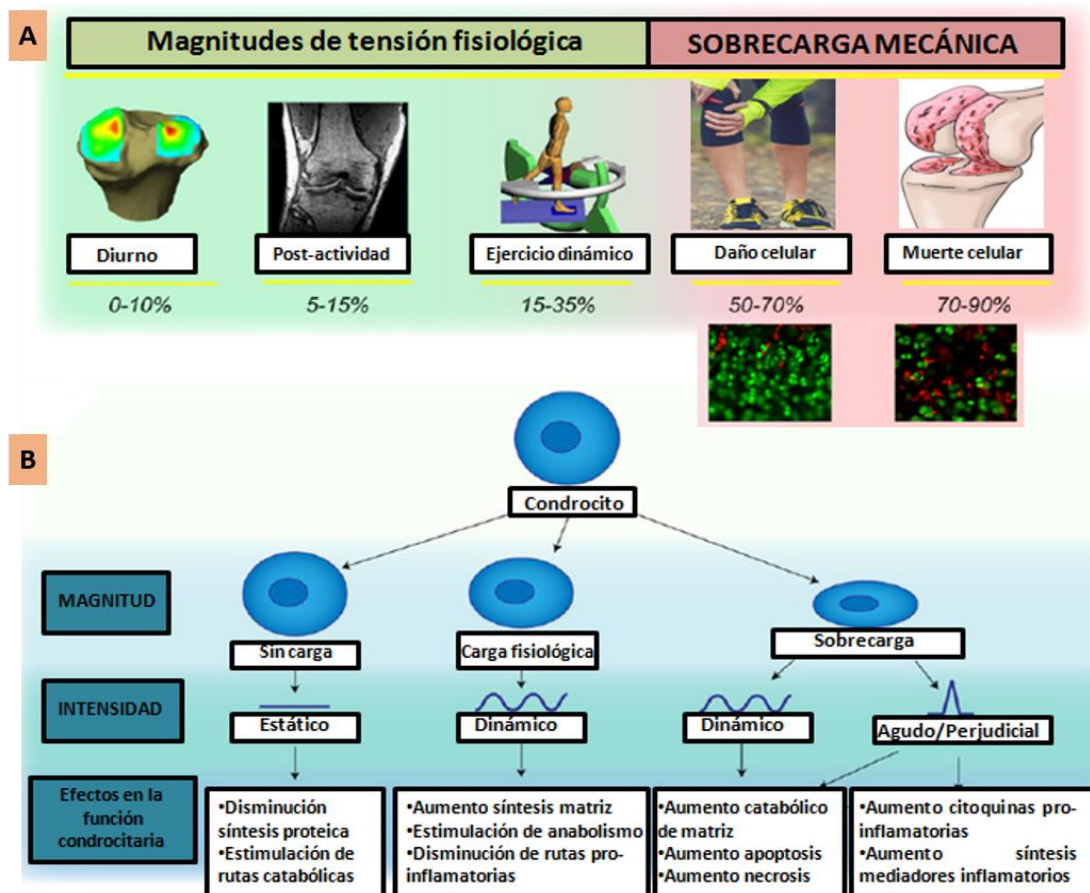


Figura 2. Representación de los efectos de la carga biomecánica en el metabolismo del cartílago. (A) Magnitudes de tensión fisiológica medidas en cartílago articular. Durante las actividades normales, los rangos de tensión diurna en reposo varían de 0 a 10%, posteriores a la actividad varían de 5 a 15% y durante la actividad varían de 15 a 35%. A magnitudes de tensión más altas (50–70%), la compresión mecánica puede causar lesiones que eventualmente inducen muerte celular por necrosis y apoptosis en los rangos de tensión más altos (70–90%). **(B) Efectos de diferentes condiciones de carga sobre la función de los condrocitos.** La carga estática disminuye la actividad metabólica del cartílago. Los niveles fisiológicos de carga dinámica pueden ser anabólicos o antiinflamatorios, mientras que los niveles hiperfisiológicos de carga dinámica y la carga perjudicial pueden inducir efectos catabólicos o proinflamatorios (Modificada de Sanchez-Adams J et al., 2014, *Current Rheumatology Reports*).

1.1.2. Hueso subcondral.

El hueso subcondral está separado del cartílago calcificado por la línea de calcificación y se compone de dos entidades anatómicas, la placa subcondral formada por una delgada capa cortical y el hueso cortical subcondral subyacente integrándose en una unidad biomecánica funcional [30, 31]. La placa subcondral se encuentra físicamente comunicada con el cartílago calcificado en las zonas sometidas a más estrés, derivando de ella el hueso cortical subcondral

que es la estructura responsable de absorber y distribuir la carga a la que es sometida la articulación [31]. Esta estructura porosa y vascularizada aporta los nutrientes esenciales al cartílago, siendo responsable del aporte del 50% de glucosa y oxígeno que recibe el condrocito [31].

Además de la unión física, también existe una comunicación molecular demostrada entre cartílago y hueso liberándose factores que llegan al condrocito desde las células óseas o viceversa [30, 32]. Este hueso subcondral es de vital importancia en la evolución de la OA, caracterizado por cambios estructurales e histopatológicos como quistes, microfisuras y esclerosis, engrosamiento trabecular, aumento del volumen del osteoide y disminución de calcio asociado a fibras de colágenos durante la evaluación de la patología [33].

Durante los primeros estadios de la enfermedad se ha descrito un aumento del remodelado óseo y pérdida de hueso subcondral, acompañándose este remodelado con un mayor daño en el cartílago [32, 34]. Por su parte, en etapas avanzadas de la enfermedad, hay controversia respecto a la aparición de esclerosis subcondral, debido a que, estudios mediante resonancia magnética nuclear demuestran que en las zonas adyacentes a las lesiones del cartílago medial en la tibia de pacientes con OA hay una mayor fracción de volumen de hueso y un mayor espesor de las trabéculas óseas [35]. Además, en las zonas donde el cartílago está dañado aparece esclerosis del hueso subcondral, mientras que las zonas adyacentes presentan osteopenia [35].

1.1.2.1. Sistema RANKL/OPG.

En el remodelado óseo del hueso subcondral tiene especial importancia la ruta que implica el receptor activador de NF κ B (RANK), su ligando (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG). Estos mediadores regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos, las células óseas encargadas de la resorción de la matriz ósea, siendo importantes en el daño deletéreo del hueso producido en patologías articulares como la OA o la artritis reumatoide [13]. La unión de RANK, presente en la superficie de los precursores de osteoclastos, a RANKL producido por los osteoblastos, células que se encargan de regenerar la matriz ósea durante el remodelado; promueve la maduración de los osteoclastos. Por su parte OPG, actúa inhibiendo la diferenciación de los osteoclastos secuestrando por unión a RANKL e impidiendo su fusión con RANK. De este modo el ratio RANKL/OPG es indicativo de resorción ósea y juega un papel crucial en la fisiopatología del hueso [36]. Estos mediadores se expresan también en

condrocitos y algunos autores han sugerido que en la OA y la OP, los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento podrían participar en la diferenciación de precursores de osteoclastos debido a que expresan RANKL en mayor cantidad que OPG [32, 37].

1.1.3. Membrana sinovial.

La membrana sinovial es un tejido blando que recubre las cavidades de las articulaciones diartrodiales, la cubierta de tendones y bursas. Está formada por una capa íntima en contacto directo con la articulación y una capa subyacente denominada subíntima. La íntima está constituida por 1 a 3 capas de células, de origen macrofágico, monocitos (sinoviocitos tipo A) y fibroblastos especializados (sinoviocitos tipo B). Por su parte, la capa subíntima está compuesta por vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos residentes y células infiltradas embebidas en la matriz de colágeno [38].

La principal función de la membrana sinovial es la de producir el líquido sinovial, que actúa como lubricante de la articulación (en concreto del cartílago articular) y también actuar como soporte para la amortiguación y reparto de fuerzas en la articulación [39]. Estudios llevado a cabo en pacientes con OA sostienen que prácticamente el 70% de los pacientes sufre de sinovitis [40]. Esta sinovitis artrósica se caracteriza por la transformación agresiva del fenotipo de los sinoviocitos B y por el desarrollo de un infiltrado inflamatorio, proliferación de la capa íntima, formación de tejido fibroso y neovascularización que en los casos de mayor gravedad resulta en hiperplasia sinovial persistente capaz de destruir el cartílago articular y producir erosiones óseas [41]. Se ha descrito que la inflamación producida en la membrana sinovial en el desarrollo de la OA conduce a la pérdida de función del tejido por permeabilidad y difusión de moléculas a través del líquido sinovial al torrente sanguíneo [40]. Además se ha evidenciado que, influye en la aparición de síntomas, pudiendo ser una fuente principal de dolor en la articulación a raíz de los procesos de neovascularización e inervación de *ново* de los tejidos [42].

1.2. Estudios científicos en modelos animales de artrosis.

Estudios en modelos animales de OA demuestran la inestabilidad de las articulaciones cuando se induce la sección de ligamentos o meniscectomía [43, 44]. Los animales desarrollan la enfermedad, caracterizada por el progresivo aumento de la hidratación del cartílago, la

interrupción de la síntesis de colágeno y el recambio de la matriz. Además, los mediadores inflamatorios y las citoquinas parecen jugar un papel importante en los modelos alterados de OA. En un modelo bovino, Hosseini SM y colaboradores [45] demostraron que el daño más temprano está representado por el reblandecimiento del cartílago, sin pérdida de colágeno. El siguiente paso es la pérdida de síntesis de colágeno y finalmente aparece la destrucción macroscópica del tejido [45].

En los modelos animales caninos, la sobrecarga en las articulaciones muestra una disminución importante en el contenido de glicosaminoglicanos, tanto en la zona superficial articular como en la zona intermedia, junto con el reblandecimiento del cartílago debido al cambio en la organización de la red de colágeno [46]. Además, se observa remodelación ósea subcondral con pérdida de condrocitos, especialmente en la zona superficial y el área calcificada aumenta considerablemente, marcando así la transición irreversible a la OA [46]. Con la destrucción de la zona superficial, la enfermedad se propaga a través de la zona intermedia y la zona profunda, resultando esto en las consecuencias que se observan en las pruebas radiológicas de la OA con pérdida del tejido cartilaginoso, estrechamiento del espacio articular, presencia de osteofitos y esclerosis subcondral [15].

Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado, además, que la OP previa a la enfermedad de OA es capaz de inducir la lesión del cartílago en un modelo de conejo donde se combinaron ambas patologías esqueléticas [47]. La correlación significativa entre el deterioro de la micro-arquitectura subcondral y el daño del cartílago indicó que los cambios en el hueso subcondral agravan el daño del cartílago cuando la OA y OP coexisten simultáneamente en los mismos individuos. En el mismo sentido, se ha publicado que en las primeras etapas del deterioro articular asociado a la OA, el hueso subcondral sufre una pérdida neta de hueso y una pérdida de calidad ósea que podría contribuir al deterioro del cartílago [48-50].

Nuestro grupo ha propuesto desde hace unos años una clasificación fenotípica de la OA primaria, en la que existiría un grupo de pacientes en los que la aparición de OA de rodilla estaría condicionada a la pérdida de estrógenos durante el periodo pre-menopáusico [2]. En la actualidad tenemos varios estudios en modelos animales encaminados a poner de manifiesto la existencia de este fenotipo que se describe en pacientes con OA incipiente. Estos pacientes podrían beneficiarse de las terapias anti-resortivas o anabólicas óseas que impedirían la pérdida de masa ósea subcondral, evitando por tanto la degeneración del cartílago adyacente [51, 52]; todo ello testado primero en los modelos de experimentación animal.

1.3. Intervenciones no farmacológicas en el manejo de la OA. Terapias basadas en las ondas de choque como posible terapia para la enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, la sobreestimulación mecánica de la articulación acelera el inicio y agrava la progresión de la OA [4]. Hasta la fecha, aunque haya tratamientos para la OA, los resultados no son esperanzadores y este tratamiento se basa principalmente en intervenciones físicas como medidas de protección articular y ejercicio físico, así como opciones farmacológicas para controlar el dolor [53]. Por esta razón, la búsqueda de nuevas vías terapéuticas es uno de los objetivos actuales en el estudio de la OA. En este sentido, las terapias de base física y en concreto, las terapias basadas en las ondas de choque están siendo en los últimos tiempos opciones para el abordaje del tratamiento de la OA [54, 55].

Las ondas de choque son ondas acústicas inducidas por generadores electrohidráulicos, piezoeléctricos, electromagnéticos o neumáticos [56]. En términos físicos, las ondas de choque son una serie de fluctuaciones cortas y definidas de energía acústica que se transmiten rápidamente por el espacio tridimensional [57]. Este tipo de energía liberada se caracteriza por una fase de presión positiva seguida de una fase de presión negativa, que causa diferentes efectos en los tejidos expuestos. La onda de choque inicialmente provoca compresión durante la fase de presión positiva, y posteriormente fuerza tensil y tensión tangencial en la fase de presión negativa [57] (Fig. 3). Además, las fuerzas tensiles parece que pudieran dirigir a la formación de microburbujas de vapor (debido al proceso de cavitación por el cambio repentino de presiones que sufre el fluido), ejerciendo diferentes efectos biológicos en zonas localizadas [57].

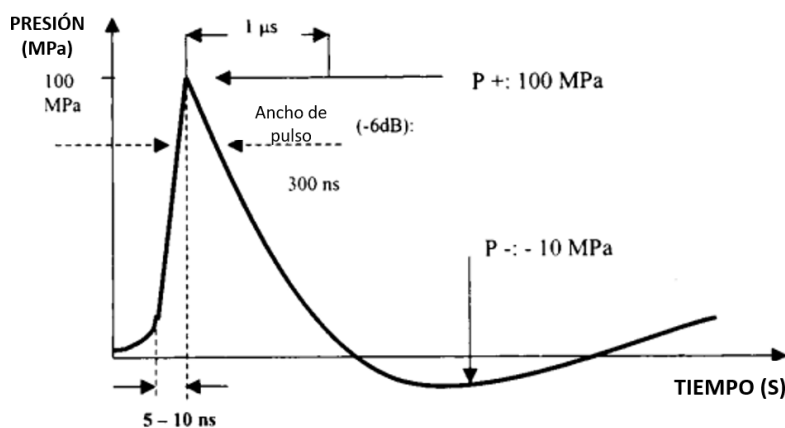


Figura 3. Forma típica de una onda de choque. Hay un aumento inicial muy rápido de la presión (nanosegundos) hasta aproximadamente 100 MPa, que finalmente es seguido por una presión negativa variable. (Modificada de Ogden JA et al., 2001, *Clin Orthop Relat Res*).

Basándose en lo anteriormente expuesto, la terapia de las ondas de choque extracorpórea (ESWT, *Extracorporeal ShockWaves Therapy*) en el tratamiento de la OA se plantea como una nueva alternativa terapéutica [56, 57]. Aunque el mecanismo no se conoce con exactitud, y los resultados en algunos estudios no son concluyentes, parece que la ESWT pudiera tener un efecto beneficioso sobre el condrocito [58], y el remodelado del hueso subcondral, disminuyendo la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-10, TNF- α y la síntesis de metaloproteinasas y proteasas que degradan la matriz de proteoglicanos [59-62].

Además, en cuanto a los síntomas dolorosos, parece que pudiera existir un efecto analgésico asociado a la ESWT como demuestran los estudios de Revenaugh 2005 [63], en caballos con OA; y más recientemente Chen y colaboradores [64] y Zhao y colaboradores [65] en humanos con OA. Finalmente evidencias emergentes muestran mejoras en la función motora después de la estimulación con ondas de choque [66, 67].

A pesar de estos prometedores resultados, se tiene poca información sobre los protocolos de tratamiento con ESWT para la OA. La intensidad en la energía de las ondas de choque aplicadas, la duración del tratamiento y el número de sesiones no están bien determinados. Parámetros como la frecuencia, la densidad de flujo energético y los pulsos son a veces elegidos al azar y varían de unos estudios a otros lo que hace difícil analizar y comparar resultados [56]. Esto es de gran importancia porque se han descrito efectos degenerativos en el tejido articular cuando se aplica sobredosis de ESWT [62]. En este sentido, los dispositivos de onda de choque de baja energía, como el ActivatorV[®], utilizados para la manipulación quiropráctica (MQ) instrumentada [68] pudieran ser una alternativa a la ESWT en el tratamiento de la OA.

La quiropráctica es una profesión centrada en el diagnóstico, tratamiento y prevención de los trastornos del sistema musculoesquelético y los efectos que estos producen en la salud en general [69]. Dada la estrecha relación del sistema musculoesquelético y sistema nervioso, la quiropráctica tiene dos funciones: por un lado, una función ortopédica, comprendiendo y considerando la función mecánica de los músculos y articulaciones; y por otro lado una función neurológica, ya que tras el tratamiento quiropráctico de una articulación también se producen efectos reflejos en el sistema nervioso, pudiendo tener efectos más amplios en el sistema nervioso autónomo y el control visceral [70].

La MQ es esencialmente manual, lo que permite al quiropráctico restaurar el rango normal de movimiento y función de las articulaciones, músculos y ligamentos. Para este propósito, el quiropráctico ejecuta movimientos rápidos (definidos como ajustes

quiropáticos) de articulaciones que están más allá de su rango de movimiento fisiológico pero sin exceder su límite anatómico [69].

Como alternativa al procedimiento manual, la MQ también se puede realizar de forma instrumentalizada con ayuda del ActivatorV® (Fig. 4). Este instrumento es un pequeño percusor que elimina la disfunción articular (o subluxación) tanto por vía mecánica como neurológica, permitiendo recuperar movimiento articular y respuesta normal del sistema nervioso [71].

Se sabe que a diferencia de los generadores utilizados para la terapia con ondas de choque, el pico de amplitud de las ondas de presión generado por el Activator es 20 veces más pequeño [72]. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la fuerza de entrada generada por el ActivatorV®, ronda entre 1-123 N directamente en las células [72] o 79 N en bloques de polímeros análogos al tejido espinal [73], produciendo una energía cinética máxima de 0.3 J, muy por debajo de la energía requerida para producir lesión tisular [74, 75].

Datos recientes han demostrado que la terapia manipulativa de extremidades ejerce efectos positivos en pacientes con OA en rodilla [76]. Sin embargo, el mecanismo implicado en esta mejora no está claro. A su vez, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la MQ induce una mejoría en la densidad mineral ósea y la micro-arquitectura ósea en un modelo animal de OP [77]. Dado el papel fundamental del hueso subcondral durante el inicio y la progresión del daño en el cartílago durante la OA, nuestra hipótesis es que la mejoría del hueso subcondral que podría inducir la MQ, prevendría la progresión de daño del cartílago asociado a la OA.



Figura 4. Instrumento ActivatorV® utilizado en la manipulación quiropráctica. Primer instrumento de ajuste quiropráctico electrónico inalámbrico registrado y aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*). Produce un empuje electrónico de presión, con cuatro configuraciones de empuje que generan una onda de fuerza expansible (*Extraído de The Activator Method®*).

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.

2.1. Infección por VIH: etiología, epidemiología y comorbilidades del virus.

Según datos actualizados en 2016 por la OMS (Organización Mundial de la Salud), se calcula que en todo el mundo habría cerca de 40 millones de personas infectadas por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), de los que aproximadamente el 5% serían niños [76]. Así mismo, estos datos mostraban que el 54% de los adultos infectados con el virus estaban recibiendo tratamiento antirretroviral y en torno al 43% en el caso de los niños. Entre 2000 y 2016, el número de nuevas infecciones por el VIH se redujo en un 39% y las defunciones asociadas al virus disminuyeron en una tercera parte. Esto significa que prácticamente 13 millones de personas infectadas conseguían sobrevivir al virus gracias al tratamiento antirretroviral en ese periodo de tiempo [78].

La infección por el VIH es ampliamente conocida y estudiada por su impacto inmunológico, ya que se replica en los linfocitos T CD4+, así como en monocitos, macrófagos y células dendríticas (todas ellas presentan los correceptores CXCR4 y CCR5 esenciales para la entrada del virus en la célula) [79]. La infección da lugar a una linfopenia muy severa que cursa con la inmunodeficiencia del paciente y las infecciones oportunistas que comprometen seriamente la salud del enfermo. La infección por VIH también afecta a otros tejidos y órganos como el corazón, el riñón y el hígado; así como al sistema nervioso central y al sistema musculoesquelético, produciendo cambios similares a los observados en el envejecimiento: aumento de la fragilidad, sarcopenia, obesidad y OP [80].

Durante casi dos décadas, las alteraciones óseas se han ido observando en el curso de la infección por VIH, caracterizándose por una disminución notable de la DMO y un aumento de la frecuencia de fracturas como resultado de la fragilidad [5]. Aunque se sabe poco sobre la patogenia de los cambios prematuros en la composición corporal y ósea en pacientes con VIH, es probable que estos cambios sean causados por el propio virus, por las terapias antirretrovirales o por la acción de la inflamación crónica generada [80]. Además, los factores de riesgo asociados a la enfermedad (desnutrición, bajo peso corporal, alto índice de tabaquismo, consumo de alcohol y bajos niveles de vitamina D) también contribuyen a este

aumento de la OP y fragilidad ósea [81]. De hecho, se plantea la hipótesis de que el aumento del remodelado óseo puede ser causado por una interacción compleja de células T con osteoclastos y osteoblastos probablemente influenciados por el VIH y la terapia antirretroviral [82]. Un meta-análisis en el que se incluyeron poblaciones mundiales de pacientes VIH positivos *naïve* (pacientes que no habían recibido previamente tratamiento antirretroviral) de 1994 a 2005, mostró un índice incremental de 6.4 veces de osteopenia en hombres de 30 a 40 años y un aumento de 3.7 veces en OP para mujeres de 35 a 75 años comparado con individuos sanos [81]. En adultos, la disminución de la DMO también se ha asociado al tratamiento prolongado con antirretrovirales y más concretamente a aquellos que en su composición cuentan con tenofovir (análogo nucleotídico) como inhibidor de la transcriptasa inversa del virus [83, 84]. Estos hechos indican que los efectos de la medicación pueden contribuir al aumento inicial de la pérdida de DMO después del inicio del tratamiento con antirretrovirales. Además, las habituales terapias administradas para prevenir la pérdida de hueso (bifosfonatos principalmente) no han demostrado tener efecto en los pacientes con VIH [80]. Pinzone y colaboradores encontraron en sus estudios que los bifosfonatos producían un aumento de la DMO en la columna lumbar, la cadera y el fémur después de 48 y 96 semanas de tratamiento en sus pacientes con VIH [85]. Sin embargo, la mayoría de los pacientes estudiados eran hombres jóvenes con VIH bien controlado y bajo riesgo de fractura.

2.2. Terapia antirretroviral: tratamiento de primera línea con tenofovir.

Tenofovir es un fármaco antirretroviral, estructuralmente análogo a adenosín monofosfato (AMP) (Fig. 5), que se incluye de forma habitual en el tratamiento del VIH y la infección crónica del virus de la hepatitis B (VHB). Debido a su estructura química, puede ser captado por las células a través de transportadores de moléculas orgánicas y en el interior celular es polifosforilado a su forma activa, inhibiendo de esta manera la transcriptasa inversa del virus del VIH y la polimerasa del VHB.

Las guías nacionales e internacionales para el tratamiento inicial de pacientes infectados con VIH recomiendan el uso de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIN/t) más un tercer fármaco activo: un inhibidor de la integrasa, un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a nucleósido (ITINN) o un inhibidor de la proteasa [86-88]. Entre los ITIN/t, tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (Fig. 5) fue aprobado por las autoridades reguladoras de medicamentos estadounidenses y europeas y estuvo disponible para el tratamiento del VIH en 2002. Desde su aprobación, este medicamento se ha incluido en

la mayoría de los regímenes recomendados, siendo el ITIN/t más utilizado durante muchos años basado en su alta eficacia establecida [86-88]. En general, mostró buena tolerancia, como se demostró en ensayos clínicos y en poblaciones de estudio [89-93]. TDF se usa ampliamente en el tratamiento de primera línea de la infección por VIH y para la terapia de pre- y post-exposición.

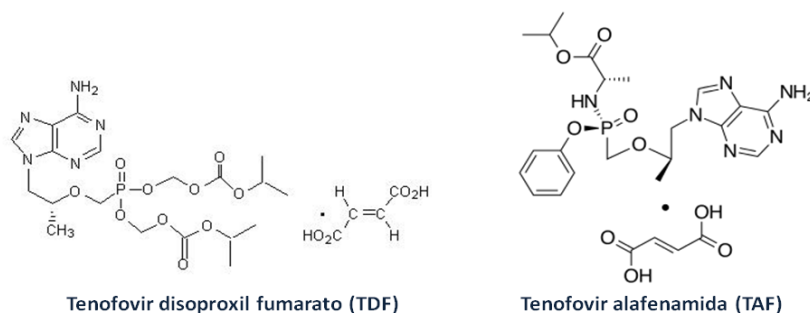


Figura 5. Estructura molecular del fármaco tenofovir en sus dos versiones comerciales actuales: TDF (tenofovir disoproxil fumarato) y la más reciente y mejorada TAF (tenofovir alafenamida fumarato).

En los últimos años ha surgido una creciente evidencia que asocia el uso de TDF con el desarrollo de disfunción tubular proximal del riñón, síndrome de Fanconi e insuficiencia renal [94, 95]. En 2015 se aprobó por primera vez tenofovir alafenamida fumarato (TAF) (Fig. 5), un nuevo fármaco oral de tenofovir, que junto con emtricitabina, elvitegravir y cobicistat (EVG/c/FTC/TAF) forman una terapia antirretroviral de primera línea. La terapia que contiene TAF tiene menos impacto en las medidas de seguridad renal y ósea en comparación con los tratamientos que contienen TDF. Se cree que esto se debe a la reducida dosis plasmática del fármaco (10-25 mg frente a los 300 mg de TDF), que es suficiente para alcanzar una concentración intracelular óptima del metabolito activo tenofovir-difosfato [96-98]. Se han descrito diversos efectos secundarios en el tratamiento con tenofovir, entre ellos algunos leves, como náuseas o mareo ocasional; y otros más graves como acumulación de ácido láctico en la sangre (acidosis láctica), trastornos graves del hígado y nuevos trastornos de los riñones o empeoramiento de los existentes, incluso insuficiencia renal. Otros efectos secundarios descritos para el fármaco incluyen cambios en el sistema inmunitario y afecciones óseas, incluso dolor o desgaste (osteopenia), que puede ocasionar fracturas [ficha técnica del fármaco, Agencia Española del Medicamento (AEMPS)].

Estudios en pacientes con VIH sin tratamiento antirretroviral han demostrado que las variaciones en el sistema RANKL/OPG de células B se correlacionaban con la DMO total de cadera y cuello femoral, lo que sugiere que la desregulación de células B promueve la pérdida

ósea inducida por el VIH a través de un desequilibrio en el sistema RANKL/OPG [99]. Además, el inicio de la terapia antirretroviral (lopinavir/ritonavir más TDF/emtricitabina) en estos pacientes induce un rápido aumento de los marcadores de resorción ósea, concretamente carboxi-terminal del colágeno tipo I (CTX), seguidos de un aumento en el RANKL y niveles de factor de necrosis tumoral (TNF- α) que se correlaciona positivamente con la magnitud de la repoblación de células T CD4+ [100].

Sobre la base de estos datos, se ha planteado la hipótesis de que la restauración de células T y la reactivación inmune conducen a la producción de RANKL y TNF- α por las células T y las células B. Estas citoquinas contribuirían a la formación y activación de osteoclastos, al aumento de la resorción ósea y, en consecuencia, a la pérdida ósea [101].

2.3. Importancia de panexina-1 en la infección por VIH.

La familia de transportadores panexina consta de tres miembros: Panx-1, Panx-2 y Panx-3 (Fig. 6). Esta familia de proteínas integrales de membrana se identificó por primera vez en mamíferos en el año 2000 por Pachin y colaboradores [102]. Las panexinas están formadas por cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y un bucle intracelular con los extremos amino y carboxilo terminal expuestos al citoplasma formando un poro [102-105] (Fig. 6). De los tres miembros existentes en la familia de panexinas, el más estudiado y del cual se conoce mejor su estructura y función es Panx-1. Estudios en este sentido revelaron que la estructura de Panx-1 en su parte extracelular está revestida por porciones de la primera hélice transmembrana y las primeras regiones de giro extracelulares, mientras que el revestimiento interno del poro está constituido por el dominio carboxilo terminal y no por el amino terminal (a diferencia de las conexinas) [105].

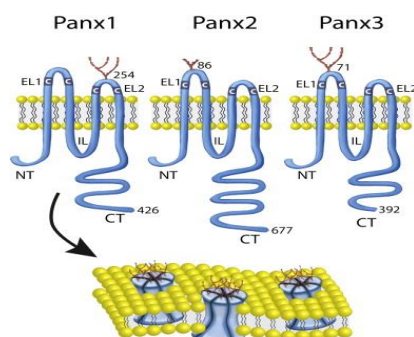


Figura 6. Representación esquemática de los tres miembros de la familia panexina. Panx-1 (426), Panx-2 (677) y Panx-3 (392) de longitudes de aminoácidos variables son proteínas integrales de membrana. EL1, EL2 (bucles extracelulares 1 y 2), IL (bucle intracelular), CT (extremo carboxilo terminal) y NT (extremo amino terminal) (Penuela S. et al., 2013, *BBA-Biomembranes*).

Trabajos realizados por Velasquez y colaboradores [106] han demostrado que la infección de células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T CD4+ por VIH causa la apertura de panexina-1 [transportador de ATP (adenosín trifosfato) a través de la membrana plasmática] de forma bifásica [107]. La unión del virus al receptor CD4 y los co-receptores CXCR4 y CCR5 induce la apertura del canal (Fig. 7), dando como resultado la liberación de ATP y la posterior activación de los receptores purinérgicos, tanto de ATP, como de sus metabolitos. Esta activación de receptores purinérgicos es necesaria para la propia entrada del virus y su posterior replicación en los linfocitos T CD4+. La apertura del transportador panexina-1 produce un aumento del calcio intracelular y la posterior reorganización de la actina, que es un paso necesario para permitir que el virus se fusione con la membrana de la célula huésped y acceda a ella [106, 107].

Por otro lado, ensayos experimentales de fibrosis en ratón, realizados por Feig y colaboradores, demostraron que el tratamiento con tenofovir produjo una disminución significativa de los niveles de adenosina, produciendo una disminución de la fibrosis [108]. A raíz de estas investigaciones, se ha descrito que tenofovir disminuye las concentraciones extracelulares de adenosina por inhibición, en dosis dependiente, del transporte de ATP mediante el bloqueo de los transportadores de esta molécula, concretamente de panexina-1 [108] (Fig. 7).

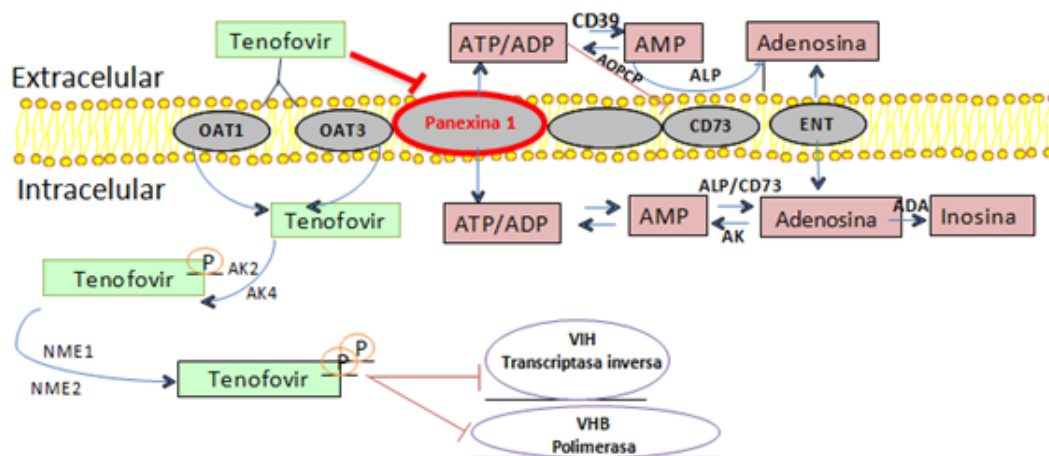


Figura 7. Mecanismo de acción de tenofovir en la célula. Para su activación, tenofovir es fosforilado en el interior celular. Las enzimas que catalizan las etapas de fosforilación son adenilato quinasas (AK2 y AK4) y nucleótido difosfato quinasas (NME1 y NME2). El transportador de aniones orgánicos 1 (OAT1) y el transportador de aniones orgánicos 3 (OAT3) son los principales transportadores involucrados en el mecanismo de activación de tenofovir. En las células infectadas por el virus, el tenofovir difosfato inhibe la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1 compitiendo con su nucleótido natural (desoxiadenosina 5'-trifosfato), para su incorporación en el ADN viral recién sintetizado. Una vez incorporado, conduce a la terminación de la transcripción del ADN. (Modificada de Feig JL et al., 2017, PLoS One).

2.4. Transportadores de adenosina y su bloqueo mediado por dipiridamol.

La adenosina se sintetiza a partir de ATP, tanto en el espacio intracelular como en el extracelular [108]. La molécula se transporta hacia el espacio extracelular a través de transportadores de nucleósidos de membrana que también median la captación de adenosina del espacio extracelular. La enzima adenosina quinasa (AK) transforma la adenosina en ATP, mientras que la adenosina desaminasa (ADA) desamina la adenosina en inosina. La formación extracelular de adenosina es el resultado de una cascada enzimática que consta de ectoenzimas, CD39 y CD73 (Fig. 8).

En la membrana celular existen transportadores de nucleósidos, de concentración y de equilibrio (CNT y ENT, respectivamente) (Tabla 1), codificadas por las familias de genes SLC28 y SLC29. Una de las principales funciones de estos transportadores es la captación de nucleósidos naturales y una variedad de fármacos derivados de nucleósidos, utilizados principalmente en la terapia contra el cáncer.

	SUBTIPO	SUBSTRATO PREDOMINANTE
CNT (SLC28)	CNT1	Nucleósidos pirimidínicos
	CNT2	Nucleósidos purínicos, uridina
	CNT3	Nucleósidos pirimidínicos y purínicos
ENT(SLC29)	ENT1	Adenosina y nucleósidos pirimidínicos y purínicos
	ENT2	Adenosina y nucleósidos pirimidínicos y purínicos
	ENT3	Adenosina y nucleósidos pirimidínicos y purínicos
	ENT4	Adenosina

Tabla 1. Clasificación de los transportadores CNT y ENT, y sus principales substratos. (Boswell-Casteel et al. 2017, *Nucleosides, nucleotides and nucleic acids*).

Las proteínas CNT y ENT se localizan principalmente en el lado apical y basolateral, respectivamente, en epitelios re-absorbentes. Esta distribución anatómica determina el flujo vectorial derivado de nucleótidos y nucleósidos. La expresión de CNT (particularmente CNT2) está asociada con la diferenciación y también está regulada nutricionalmente en los epitelios intestinales, mientras que las cantidades de proteína ENT (principalmente ENT1) se incrementan cuando las células están expuestas a estímulos proliferativos como EGF, TGF- α o heridas [109]. En cuanto a los transportadores ENT se clasifican en dos grupos principales: los

transportadores sensibles a las concentraciones del inhibidor nitrobenclitioisina (NBTI) y los que no se vieron afectados por este inhibidor o lo hicieron a concentraciones más altas (μM o más altas) [110]. Además también se conoce que la actividad de estos transportadores es dependiente del pH del medio, siendo especialmente estimulados a pH ácido [111].

En el laboratorio hemos demostrado que el bloqueo de los transportadores ENT1 por dipiridamol (**Fig. 8**), farmacológicamente utilizado como inhibidor de la agregación plaquetaria por su acción inhibitoria sobre fosfodiesterasa; produce la inhibición del transporte de adenosina al interior celular. De esta manera, disminuye la resorción ósea, favoreciéndose la formación de hueso nuevo, a través de un mecanismo dependiente de $A_{2A}R$ [112]. Igualmente, se ha comprobado que ticagrelor, otro antiagregante plaquetario empleado para la trombosis arterial, fue capaz de bloquear el transportador ENT1 de adenosina, produciendo un aumento de la concentración extracelular y estimulando la regeneración ósea mediante la actividad de $A_{2A}R$ [113].

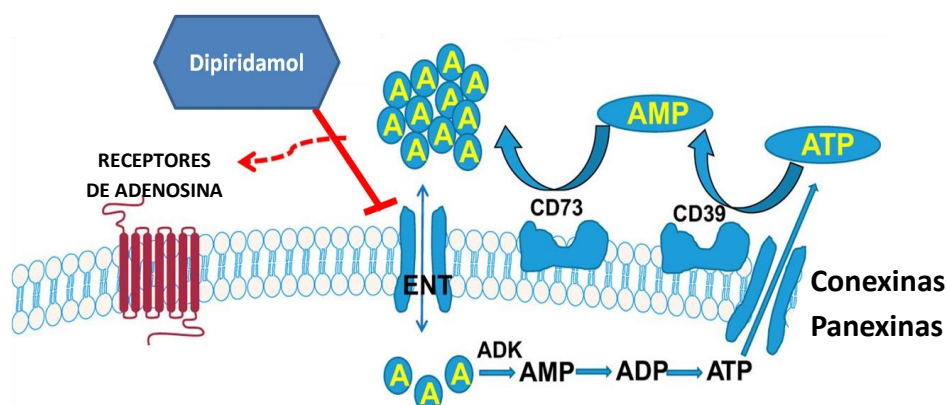


Figura 8. Efecto de dipiridamol en la regulación purinérgica y el aumento de la adenosina extracelular. El inhibidor no selectivo de ENT1/ENT2 dipiridamol estimula el aumento de AMPc a través de la inhibición de la fosfodiesterasa y la activación de $A_{2A}R$ por un aumento de adenosina extracelular secundario a la inhibición del transportador.

2.5. Receptores purinérgicos de adenosina.

Como mencionamos en el apartado anterior, la adenosina se genera tanto intracelularmente como extracelularmente, como producto de la hidrólisis de los nucleótidos de adenina. Su acción en la célula radica en la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G [114]. Los receptores P1 de adenosina se clasifican en 4 tipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (**Fig. 9**) distribuidos heterogéneamente en los diversos órganos y tejidos, desempeñando diversas funciones reguladoras en enfermedades tales como: enfermedades isquémicas cerebrales,

trastornos del sueño, trastornos inmunitarios e inflamatorios y cáncer [114]. Son receptores acoplados a proteínas G, compuestos por siete dominios trans-membrana de unos 21-28 residuos de aminoácidos formando una α -hélice entre los extremos N-terminal extracelular y C-terminal intracelular. Las hélices trans-membrana se unen entre sí a la vez por residuos hidrofóbicos de igual tamaño. Los receptores A_1 y A_2 fueron descritos inicialmente en 1979 por van Calker y colaboradores [115] en sus estudios en cultivos celulares de neuronas donde comprobaron que los receptores activaban (en el caso de A_2) e inhibían (en el caso de A_1) la actividad adenilato ciclasa. Los receptores A_2 por su parte se subdividen en dos: A_{2A} y A_{2B} . Ambos se diferencian en la capacidad de activar la adenilato ciclasa vía sitios de unión de alta o baja afinidad y en los perfiles farmacológicos [116].

Los receptores A_1 y A_{2A} poseen una alta afinidad por la adenosina, mientras que el A_{2B} y el A_3 muestran una afinidad relativamente menor por la adenosina, por lo que su regulación en los diferentes tejidos y órganos es dosis dependiente. A su vez, los niveles basales de estimulación de los cuatro subtipos por el agonista endógeno difieren entre sí [114, 117]. Fuera de la célula, nuevamente hay degradación metabólica del ATP a la adenosina, que activa uno de los cuatro receptores de adenosina. Una vez que los receptores se activan, hay un acoplamiento positivo ($A_{2A}R$, $A_{2B}R$) o negativo (A_1R y A_3R) a adenilato ciclasa (AC) con la correspondiente activación o inhibición de AMPc, que activa de forma diferencial PKA (proteína quinasa A), EPAC (proteína de intercambio activada por AMPc) y varias vías intracelulares [114].

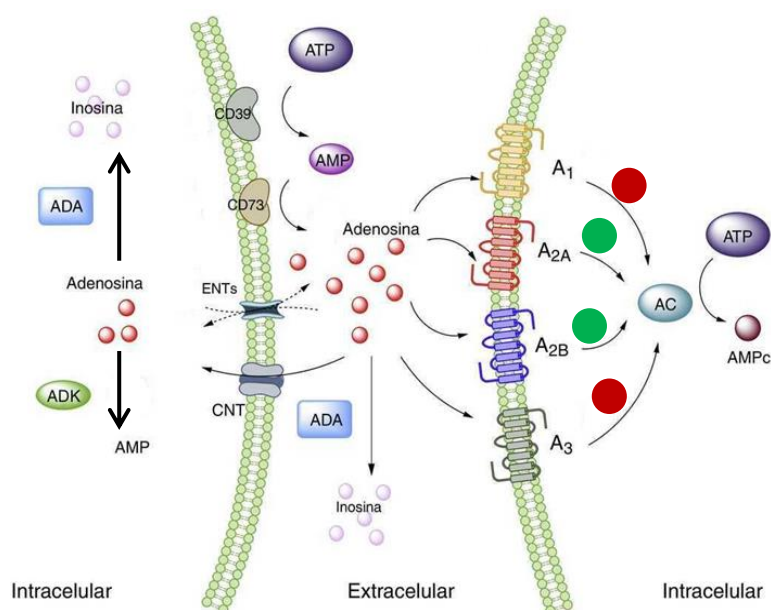


Figura 9. Esquema que muestra la síntesis y degradación de adenosina y sus receptores en la célula. AC: adenil ciclasa; ADA: adenosín deaminasa; ADK: adenosín quinasa; AMP: adenosín monofosfato; ATP: adenosín trifosfato; CNT: transportadores de nucleósidos concentrativos; ENTs: transportadores de nucleósidos equilibrativos (Modificada de Meriño M et al., 2017, *Endocrinol Diabetes Nutr*).

2.5.1. Receptor A_{2A} de adenosina y su implicación en la osteoclastogénesis.

La activación de A_{2A}R inhibe la función y diferenciación de los osteoclastos. Se ha demostrado que el uso de inhibidores o la eliminación de A_{2A}R anula la estimulación de la osteoclastogénesis *in vitro*, además se comprobó por densitometría (DEXA) y microCT que los ratones deficientes en A_{2A}R tienen una marcada reducción de la densidad ósea, con un marcado aumento en el número y función de los osteoclastos [118]. Además, en trabajos realizados por Mediero y colaboradores se observó que la estimulación del receptor A_{2A} produjo un incremento de la actividad de cAMP y PKA, inhibiéndose la maduración de los osteoclastos [119]. Así mismo, la estimulación del A_{2A}R inhibió la translocación nuclear de p50/p105 NFκB y activó ERK1/2 por un mecanismo dependiente de PKA. Paralelamente, se demostró que la activación de A_{2A}R es capaz de inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1β y TNF-α por los osteoclastos [118].

Los efectos inhibitorios de A_{2A}R sobre la diferenciación de osteoclastos, también pueden tener una gran importancia terapéutica. Mediero y colaboradores propusieron otro papel importante *in vivo* para la activación de A_{2A}R en osteoclastos. En un modelo de osteólisis inflamatoria inducida con partículas, se demostró que los agonistas A_{2A}R reducían la erosión y pérdida de hueso al disminuir la inflamación y el número de osteoclastos [120]. Además, se conoce que la adenosina media en los efectos antiinflamatorios de metotrexato [121]. La capacidad de metotrexato para inhibir la formación de osteoclastos y estimular la reabsorción ósea en pacientes con artritis reumatoide (AR) puede estar mediada por la adenosina, a través de la estimulación de A_{2A}R y la inhibición de la secreción de TNF-α e IL-1β [118]. Consistente con esta hipótesis Mazzon y colaboradores demostraron que la adenosina, actuando a través del A_{2A}R, podría reducir la resorción ósea en un modelo de ratón de artritis reumatoide (AR) [122].

2.5.2. Receptor A_{2A} de adenosina y su implicación en la osteoblastogénesis.

Estudios realizados por Russell y colaboradores [123] demostraron que en un modelo inflamatorio *in vitro* en la línea celular osteoblástica MG63, la inhibición producida por adenosina de la secreción de IL-6 inducida por lipopolisacárido, se debió a la activación de la vía cAMP/PKA a través del estímulo de A_{2A}R. Por otra parte, Katebi y colaboradores mostraron

que la adenosina, actuando a través de $A_{2A}R$, juega un papel crítico promoviendo la proliferación de osteoblastos derivados de médula ósea de ratón [124]. Finalmente, se demostró que $A_{2A}R$ está regulado al alza en la diferenciación de osteoblastos y aumenta la actividad fosfatasa alcalina [125]. Además, la adenosina modula la viabilidad celular en la línea celular de osteoblastos MC3T3 en respuesta al daño oxidativo por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [126]. Tanto A_1R como la activación de $A_{2A}R$ aumentan significativamente la viabilidad celular y también protege contra el daño oxidativo [126].

Por otro lado, se ha comprobado que la activación de $A_{2A}R$ por agonistas aumenta el número de osteoblastos *in vivo* [120, 126-128] y que su eliminación, revierte tal efecto produciendo daños deletéreos óseos [118, 120, 129]. En este sentido, Mediero y colaboradores demostraron que la activación de $A_{2A}R$ por dipiridamol (de forma indirecta) y por su agonista CGS21680 estimuló la expresión de marcadores importante para la diferenciación de osteoblastos *in vivo*; así como un aumento del número de osteoblastos y regeneración en la lesión inducida en la calvaria de los ratones [128]. Estos efectos se igualaron a los vistos con la proteína morfogénica ósea de tipo 2 (BMP-2, proteína usada habitualmente para la regeneración ósea en cirugía ortopédica y traumatología), incluso siendo mayor el potencial osteogénico con dipiridamol en comparación con BMP-2. En cambio, en ratones a los que se le deleccionó el $A_{2A}R$, ni CGS21680 ni dipiridamol mejoraron la regeneración ósea descrita anteriormente [128]. Adicionalmente, Ishack y colaboradores demostraron la capacidad de regeneración ósea en modelos murinos de calvaria al revestir implantes sintéticos de fosfato tricálcico/hidroxiapatita con dipiridamol [129]. En este caso se observó que dipiridamol se liberaba de forma constante del implante y se producía un incremento en la formación ósea similar a la conseguida por BMP-2, pero sin el crecimiento ectópico de hueso promovido por esta última [129]. En consonancia con lo descrito, un trabajo realizado por Mediero y colaboradores demostró que, no sólo dipiridamol y CGS21680 son capaces de estimular la diferenciación de osteoblastos a través de $A_{2A}R$, sino que; ticagrelor también potenció la diferenciación y función de los osteoblastos en un modelo de calvaria murina [113]. De igual modo que ocurría para dipiridamol, la delección de $A_{2A}R$ produjo la desaparición del estímulo osteogénico [113]. Además, recientes estudios tanto en modelos de calvaria murinos, como en modelos de lesión mandibular en conejos; han demostrado el efecto estimulante de dipiridamol en la regeneración ósea de las lesiones causadas, a través de la activación de $A_{2A}R$ [130, 131]. Estos datos indican una importante ventaja terapéutica a tener en cuenta en cuanto al remodelado óseo y $A_{2A}R$.

OBJETIVOS

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.

Se evaluaron los efectos de la MQ en la progresión de la OA en un modelo animal de conejo; y se estudiaron posibles mecanismos moleculares implicados en tales efectos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto de la MQ en el remodelado óseo a nivel de hueso cortical subcondral y trabecular subcondral de tibia.
2. Estudiar los posibles cambios del sistema RANKL/OPG en el hueso subcondral y cartílago asociado a los efectos de la MQ.
3. Evaluar el daño en cartílago de tibia y fémur, tanto en animales sanos como artrósicos sometidos y no a la MQ.
4. Analizar el efecto de la MQ en la sinovitis asociada a la OA en el modelo: expresión de marcadores proinflamatorios, degradación de la matriz extracelular, infiltrado celular y angiogénesis/inervación.

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.

Se estudió el modo en que tenofovir afecta a la diferenciación y función de las células óseas alterando el metabolismo de ATP y/o adenosina, y las posibles aproximaciones terapéuticas a través de la activación del A_{2A} R de adenosina. Se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el efecto directo de tenofovir y su posible regulación tras la activación de A_{2A} R de adenosina en la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos *in vitro*, así como las vías de señalización intracelular involucradas.
2. Caracterizar el efecto de tenofovir *in vivo* en ratones C57BL/6 macho sanos y en un modelo de OP (ratonas C57BL/6 ovariectomizadas). Estudio de la activación del A_{2A} R de adenosina como una posible aproximación farmacológica para la osteopenia producida por el VIH.
3. Estudiar los cambios en marcadores óseos producidos por tenofovir en pacientes con VIH *naïve* en estadios iniciales de la enfermedad, identificando nuevos objetivos terapéuticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.

1.1. MATERIAL Y REACTIVOS

- **Xilacina:** (Rompun, Bayer, Kiel, Alemania).
- **Ketamina:** (Ketolar, Pfizer, Hameln, Alemania).
- **Tiopental:** (Tiobarbital, Braun medical S.A. Barcelona, España).
- **Acetato de sodio, ácido acético glacial, tartrato de sodio, Triton X-100, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hematoxilina, eosina, reactivo de tinción azul de toluidina:** Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EE.UU.).
- **Kit de cuantificación de proteínas con ASB:** Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, EE.UU.).
- **Kit de extracción de ARN total E.Z.N.A.:** Omega Bio-Tek (VWR International, Norcross, GA, EE. UU.).
- **Kit de PCR MuLV transcriptasa inversa, inhibidor de ARNasa, hexámeros aleatorios, MgCl₂, PCR buffer II, y dNTPs, Power UP SYBR Green MasterMix:** Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.).
- **DPX (Di-N-Butilftalato xileno):** VWR International (Lovaina, Bélgica).
- **Sal disódica fosfato de naphтол AS MX, reactivo de tinción verde rápido (Fast Green), sal de tinción fast red violet LB, tampón para extracción de proteínas RIPA, cóctel inhibidor de proteasas, cóctel inhibidor de fosfatasa:** Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **Software Quantity One, kit de membranas de nitrocelulosa, almohadillas y buffer de transferencia:** BioRad (Berkeley, CA, EE.UU.).
- **Anticuerpos secundarios de conejo y ratón HRP de hospedador caprino:** GE Healthcare (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.).
- **Anticuerpo secundario biotinilado para conejo y ratón IgG:** Amersham (Arlington Heights, IL, EE.UU.).
- **Anticuerpos primarios para RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B), osteoprotegerina (OPG), fosfatasa alcalina (FA), COX-2 (ciclooxigenasa 2), MMP-3 (metaloproteinasa 3), colágeno VI, β -actina y Netrina-1:** Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE.UU.).

- **Anticuerpos primarios para CD31, VEGF-164 (factor de crecimiento endotelio-vascular 164), colágeno X, MMP-13 y Semaforina 3A:** Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- **Anticuerpos primarios para IL-1 β , TNF- α :** Cloud-Clone Corporation (Houston, TX, EE. UU.).
- **Suero bovino fetal (SBF):** Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.).
- **Tetrahidroclorato de 3,3 diaminobencidina y anticuerpo primario para RAM-11:** Dako (Camarillo, CA, EE.UU.).
- **Luminata Crescendo™ Western HRP Detection:** Merck Millipore (Billerica, MA, EE.UU.)
- **Conejos:** Granja San Bernardo (Pamplona, España).
- **microCT de alta resolución GE eXplore Locus ICT, software MicroView Advanced Bone Analysis Plus, Amersham Imager 600:** GE Healthcare (Londres, Reino Unido).
- **ActivatorV®:** Activator Methods International (Phoenix, AZ, EE.UU.).
- **Micrótopo Leica HM 325 Rotary Microtome, microscopio Leica DMD108, software Leica LAS EZ:** Leica Microsystems Inc. (Buffalo Grove, Illinois, EE.UU.).
- **Escáner Coreo Iscan Au:** Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, EE. UU.).
- **Software ImageJ:** NIH (Bethesda, MD, EE. UU.).
- **GraphPadPrism V 5.01:** GraphPad (La Jolla, CA, EE.UU.).

1.2. ANIMALES

La experimentación fue aprobada por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del IIS-Fundación Jiménez Díaz y la Conserjería de Agricultura y Pesca de la Comunidad de Madrid, con número PROEX 135/16; y de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para disminuir el dolor animal. Trece conejos macho *Nueva Zelanda*, de entre 12-13 semanas de edad (Granja San Bernardo; Pamplona, España), fueron incluidos en el estudio. Los conejos se colocaron en jaulas individuales en condiciones estándar (temperatura ambiente $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $55 \pm 5\%$ e iluminación con un fotoperiodo de 12 h / 12 h de luz / oscuridad), se les dio alimento y agua *ad libitum* y se les permitió moverse sin restricción.

1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJOS

Después de 2 semanas de adaptación a las condiciones de estabulación y las instalaciones, se indujo la OA en ambas rodillas en 10 de los 13 conejos del estudio. Para ello se llevó a cabo la sección del ligamento cruzado anterior y por consiguiente, la desestabilización de la articulación, siguiendo el protocolo quirúrgico estandarizado [132]. Los 3 conejos restantes se utilizaron como controles sanos. La cirugía se realizó siempre bajo anestesia general por administración intramuscular de 20 mg/ml de xilacina y 50 mg/ml de ketamina.

Una vez realizada la operación, los conejos guardaron reposo durante 2 semanas para iniciar la MQ con ActivatorV® (Fig. 10 A). La manipulación se realizó con un único pulso con una precarga de 3,71 kg/m, aplicada sobre el tubérculo tibial de la extremidad posterior derecha del conejo en un ángulo de 90° de medial a lateral con una fuerza de 0,3 kgm²/s² [72]. De forma paralela, la extremidad posterior izquierda recibió una “falsa” manipulación que consistió en un pulso al aire de ActivatorV® y posterior apoyo en el tubérculo tibial (Fig. 10 B).

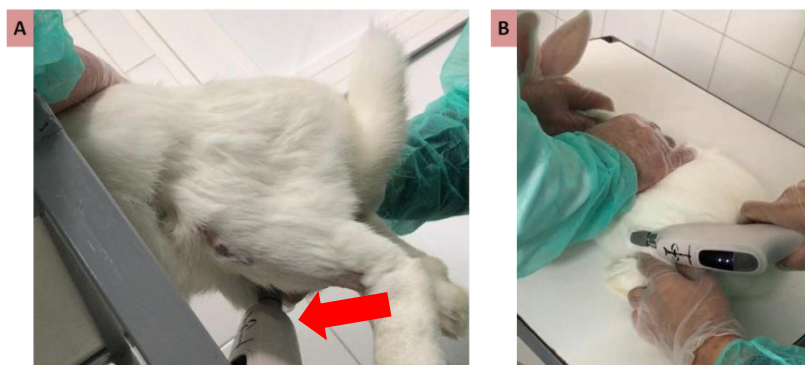


Figura 10. Manipulación quiropráctica realizada con ActivatorV® en conejos artrósicos. (A) Verdadera manipulación en la extremidad derecha de los conejos artrósicos (OAVM). Se señala la posición de ActivatorV® en la manipulación (flecha roja). **(B)** Falsa manipulación realizada en la extremidad izquierda de los conejos artrósicos (OAFM).

El estímulo mecánico se repitió tres veces por semana durante 8 semanas (Fig. 11). Finalmente, los animales se sacrificaron mediante una inyección intracardiaca de pentobarbital (50 mg/kg, tiobarbital). Los huesos largos (tibia y fémur) y membranas sinoviales se extrajeron para su análisis histológico e histomorfométrico (en el caso de los huesos largos).

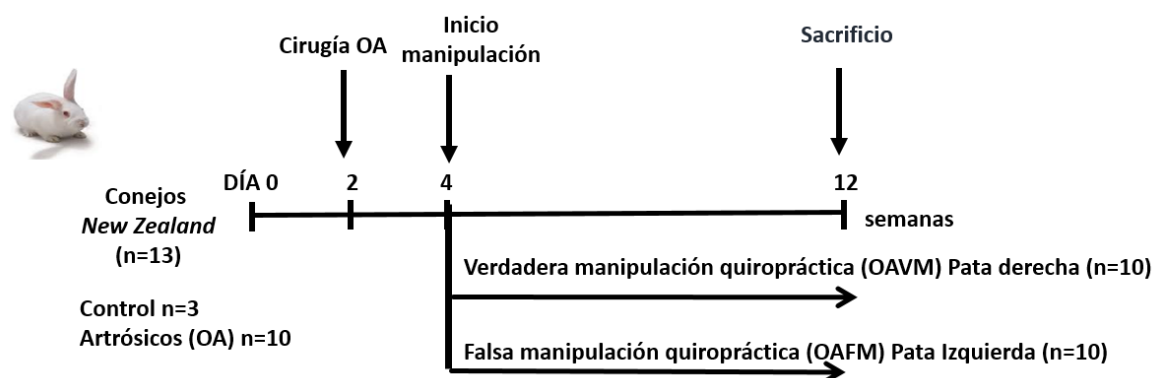


Figura 11. Cronograma del modelo de OA en conejo y de la manipulación quiropráctica realizada. Diez conejos se intervinieron quirúrgicamente para inducirles la OA por disección del ligamento cruzado anterior en ambas rodillas, previa anestesia del animal. Tras dos semanas de reposo, se comenzó con la MQ durante 8 semanas (1 impulso, 3 veces por semana en la articulación derecha, dejando la izquierda como control de falsa manipulación). Los 3 animales restantes se usaron como controles sanos.

1.3.1. Análisis de la micro-arquitectura estructural del hueso mediante microtomografía computarizada (microCT).

Para estudiar la micro-arquitectura del hueso, las tibias derecha (verdadera MQ) e izquierda (falsa MQ) de los conejos se escanearon utilizando un sistema de microtomografía computarizada (microCT) de alta resolución. Los ajustes del equipo de escaneo fueron los siguientes: 80 kV de energía y 450 μ A de corriente. La adquisición de imágenes consistió en 400 proyecciones recopiladas en una rotación completa del soporte de la muestra. Los datos en bruto resultantes se reconstruyeron utilizando un algoritmo de proyección filtrada hasta una imagen final con una resolución de 45 μ m en las tres dimensiones espaciales. Se analizaron imágenes obtenidas con un tamaño de vóxel isotrópico de 46 μ m y 0,5 mm². Para el hueso cortical subcondral, las regiones de interés analizadas comenzaron en la zona más externa de hueso cortical subcondral de la tibia hasta que empezaron a aparecer las primeras trabéculas, aproximadamente 20 secciones en todas las muestras. Inicialmente se analizó la placa tibial total y posteriormente se discriminaron las placas tibiales internas y externas. Para el hueso trabecular subcondral se eligió una región característica en la parte postero-lateral medial del hueso trabecular subcondral [133]. Las imágenes reconstruidas de hueso cortical subcondral y trabecular subcondral se analizaron utilizando el software MicroView versión 2.2 con Advanced Bone Analysis Plus. Se analizó tanto densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO), como los siguientes parámetros trabeculares: volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), grosor trabecular (Tb. Th), número trabecular (Tb. N) y separación trabecular (Tb. S).

1.3.2. Estudio histológico de marcadores de remodelado óseo en tibias de conejos sanos y artrósicos (verdadera y falsa manipulación).

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA RANKL, OPG Y FOSFATASA ALCALINA (FA).

Las tibias extraídas, se fijaron en formaldehído al 4% y posteriormente se procedió a su descalcificación con EDTA 10% a pH 7,7, durante 16 semanas. Una vez se comprobó que el tejido estaba correctamente descalcificado y se podía cortar con facilidad, se fueron haciendo cortes en el plano sagital a lo largo de la porción central de la placa tibial (dividimos el hueso en dos porciones exactamente idénticas en su plano sagital). Tras procesar el tejido y una vez cortado, se incluyó en parafina. Se realizaron secciones de 5 µm con micrótopo rotatorio Leica HM 325. Se analizó la expresión en hueso subcondral y cartílago de tres moléculas claves en el proceso resortivo: RANKL, OPG y FA (1:200). El anticuerpo primario se detectó, en el caso de RANKL y FA, con secundario IgG anti-ratón biotinilado de cabra (1:200) e IgG anti-conejo biotinilado de cabra (1:200) en el caso de OPG. Posteriormente, se visualizó la expresión de la proteína con el conjugado ABCComplex y usando tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobenzidina como cromógeno. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina para hacer contraste y se montaron en medio DPX. El análisis de expresión se realizó con el software ImageJ, previo escaneo de los portaobjetos con el escáner Coreo Iscan Au. Para cuantificar cada una de las muestras analizadas, se tomó el porcentaje de área positiva marcada por el anticuerpo con respecto al área total seleccionada. Se utilizaron como controles negativos los cortes histológicos a los que no se le añadió anticuerpo primario y se siguió el protocolo tal cual se describió anteriormente.

HISTOQUÍMICA PARA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD TRAP EN OSTEOCLASTOS.

El estudio de la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) específica para osteoclastos se realizó empleando un protocolo de histoquímica estandarizado en el laboratorio: tras la desparafinación, las muestras se incubaron en tampón acetato 0,2 M durante 90 minutos y posteriormente se incubaron en un tampón específico para TRAP consistente en: acetato 0,1 M, 0,3 M Tartrato sódico, 10 mg/ml de fosfato de naftol AS-MX, 0,1% Triton X-100, y 0,3 mg/ml de reactivo de tinción fast red violet LB durante 30 minutos; para ver la actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato. Finalmente las muestras se sometieron a contraste con el reactivo de tinción *Fast Green* durante 45 segundos y se montaron con medio de montaje DPX, para realizar las respectivas fotografías con microscopio electrónico Leica DMD108. Para cuantificar cada una de las muestras analizadas, se tomó el número de osteoclastos teñidos por región analizada en cada muestra.

1.3.3. Evaluación del daño en el cartílago de fémur y tibia en conejos artrósicos y sanos.

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL CARTÍLAGO FEMORAL

Se realizó un análisis cegado macroscópico de todos los cartílagos femorales para valorar el daño producido en cuanto a erosión, pérdida de tejido, presencia de osteofitos y aspecto del tejido. La puntuación de los cóndilos femorales osciló de 0 a 3, en orden creciente de deterioro (0: aspecto normal, 1: aspecto fibroso y proliferación celular, 2: erosión parcial del espesor y fibrilación y 3: erosión completa y presencia de osteofitos). Este análisis macroscópico se basó en los estudios realizados previamente por Laverty y colaboradores [134].

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL CARTÍLAGO TIBIAL

El análisis histológico de las tibias se llevó a cabo como se describe a continuación. Tras procesar el tejido y una vez cortado, se incluyó en parafina. El cartílago se fue cortando en secciones de 5 μm con micrótopo rotatorio Leica HM 325 y se tiñó con safranina (se une a los proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago) para evaluar el daño del cartílago. Estas muestras se evaluaron con ayuda de microscopio electrónico Leica DMD108, siendo cegado en cuanto al origen de la muestra y utilizando un sistema estandarizado de puntuación de calificación de *Mankin* modificado en el laboratorio a partir de lo descrito previamente por Tiraloché [135]. En su totalidad, esta evaluación histológica incluye cuatro parámetros diferentes a valorar con una graduación ascendente en función de la gravedad del daño: estructura, tinción de proteoglicanos (safranina), pérdida de condrocitos y formación de clonas. Las imágenes se tomaron previo escaneo de los portaobjetos con el equipo Coreo Iscan Au.

1.3.4. Evaluación del daño en la membrana sinovial de los conejos artrósicos y sanos.

Las membranas sinoviales de ambas rodillas de cada conejo se seccionaron con un grosor de 5 μm con micrótopo rotatorio Leica HM 325 y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La sinovitis se evaluó de acuerdo con la puntuación de *Krenn Score* con ayuda del microscopio electrónico Leica DMD108. Este protocolo de valoración de daño sinovial [136] está ampliamente estandarizado en la bibliografía y consiste en estudiar y valorar la sinovial

atendiendo a: la hiperplasia del revestimiento sinovial, la activación del estroma relacionado con la fibrosis y la infiltración de tejidos. Cada ítem fue evaluado de forma cegada utilizando una sub-escala de 0-3 puntos, donde 0 indicó ausencia, 1 daño leve, 2 daño intermedio y 3 evidencia severa de cada uno de los parámetros de sinovitis a analizar, marcados por el *Krenn Score*. La puntuación total se obtuvo de la suma de las calificaciones parciales con una puntuación total máxima de 9. Las imágenes se tomaron previo escaneo de los portaobjetos con el equipo Coreo Iscan Au.

1.3.5. Estudio inmunohistológico de detección de células inflamatorias y neo-vascularización en la sinovial de los conejos en estudio.

Para ver los cambios observados en el *Krenn Score* sinovial, principalmente en cuanto a infiltración y vascularización; se identificaron macrófagos utilizando un anticuerpo monoclonal anti-conejo específico para RAM-11 (proteína específica de macrófagos alveolares), de acuerdo con el protocolo descrito previamente [137]. El anticuerpo se detectó con secundario IgG anti-ratón biotinilado de cabra (1:200). Posteriormente, se visualizó la expresión de la proteína con el conjugado ABComplex y usando tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobenzidina como cromógeno. Los tejidos se contrastaron con hematoxilina y se montaron en medio DPX. El análisis de expresión se realizó con el software ImageJ, previo escaneo de los portaobjetos con el escáner Coreo Iscan Au. Para cuantificar cada una de las muestras analizadas se tomaron 5 áreas aleatorias por portaobjetos y se cuantificó el porcentaje de área positiva marcada por el anticuerpo en el total de área seleccionada. Se utilizó como control negativo una muestra a la que no se le añadió anticuerpo primario.

Para evaluar la neo-vascularización, se llevó a cabo la inmunohistoquímica de CD31 en la membrana sinovial, como marcador de células endoteliales vasculares. Se siguió el mismo protocolo descrito para la inmunohistoquímica de RAM-11. Seguidamente, se escanearon las muestras en el escáner para portaobjetos Coreo Iscan Au y se evaluó la expresión de CD31. Para cuantificar cada una de las muestras analizadas, se tomó el porcentaje de área positiva marcada por el anticuerpo con respecto al área total seleccionada. Se utilizaron como controles negativos los cortes histológicos a los que no se les añadió anticuerpo.

1.3.6. Análisis de expresión proteica de marcadores de inflamación y fibrotización en membrana sinovial de conejos sanos y artrósicos (manipulados y no manipulados).

La extracción de proteína total de las membranas sinoviales se realizó por lisis celular en tampón RIPA, complementado con el cóctel inhibidor de proteasas y el cóctel inhibidor de fosfatasas. El contenido de proteína se determinó mediante un método estándar a base de ácido bicinónico, utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Los extractos de proteína sinovial (40 µg para VEGF-164, 40 µg para COL VI y 60 µg para MMP3) se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y al 8% (en el caso de colágeno VI) en condiciones reductoras. Por otro lado, los extractos de proteínas (25 µg para COX-2, IL-1β y TNF-α) se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y 15%, respectivamente. Después de la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, seguidas de bloqueo con albúmina de suero bovino (ASB) al 3% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.6 y NaCl 150 mM con Tween-20 al 0,05%. Siguiendo con el protocolo, se procedió a la incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: VEGF-164 anti-conejo (1:1000), COL VI anti-conejo (1:1000), MMP3 anti-conejo (1:1000), IL1-β anti-conejo (1:150), TNF-α anti-conejo (1:200) y COX-2 anti-conejo (1:1000). Al día siguiente se procedió al lavado de las membranas incubadas con los anticuerpos primarios y se añadió IgG anti-conejo, anti-ratón y anti-cobaya, respectivamente según correspondía a cada primario, conjugados con peroxidasa como anticuerpos secundarios. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, las membranas se revelaron mediante escaneo densitométrico utilizando Amersham™ Imager 600. Como control de carga, se utilizó el anticuerpo anti-β-actina. Las bandas de proteínas se identificaron con la aplicación del reactivo quimioluminiscente Luminata Crescendo™. La cuantificación se llevó a cabo con el software Quantity One normalizando con el correspondiente control de carga.

1.3.7. Análisis de expresión proteica de neurotrofinas tras la manipulación quiropráctica en las articulaciones de conejos artrósicos.

Los extractos de proteína sinovial (40 µg para Sema 3A y Netrina-1) se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones reductoras. Después de la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, seguidas de bloqueo con ASB al 3% en Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 y NaCl 150 mM con Tween-20 al 0,05%. Siguiendo con el protocolo,

procedimos a la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario: Sema 3A y Netrina-1 anti-conejo (1:1000). Al día siguiente se procedió al lavado de las membranas incubadas con los anticuerpos primarios y se añadió IgG anti-conejo al anticuerpo primario, conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, realizamos el revelado de las membranas. Como control de carga, se utilizó el anticuerpo anti- β -actina (1:1000). Las bandas de proteínas se identificaron analizaron mediante escaneo densitométrico utilizando Amersham™ Imager 600, con la aplicación del reactivo Luminata Crescendo™ Western HRP Detection.

1.3.8. Análisis de expresión génica de Sema 3A tras la manipulación quiropráctica en las articulaciones de conejos artrósicos.

Para el análisis de expresión génica, el ARN total se extrajo utilizando kit de extracción de ARN total E.Z.N.A siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, el ARN total se retrotranscribió utilizando el kit de PCR MuLV transcriptasa inversa en concentración de 2,5 U/ μ l, incluyendo en la reacción los siguientes reactivos: inhibidor de ARNasa 1U/ μ l, hexámeros aleatorios 2,5 U/ μ l, MgCl₂ 5 mM, PCR buffer II 1X, y dNTPs 1mM. La cuantificación relativa de la expresión génica fue realizada utilizando RT-PCR en tiempo real con Step One Plus y empleando Power UP SYBR Green MasterMix según el protocolo del fabricante. Los *primers* utilizados en la amplificación por PCR en tiempo real se detallan en la **tabla 2**. Se utilizó el método Pfaffl [138] para la cuantificación relativa.

GEN	SECUENCIA DE LOS <i>PRIMERS</i>
<i>SEMA 3A</i>	Pareja 1 Fw: CCCAGCCATTAAACCTTCAG Rv: CCGCTCTGCAAATGTGATTA Pareja 2 Fw: GCAGCACCATCTGGAGAAGT Rv: TGAGCATGCAGAGGTATTGC
<i>GAPDH</i>	Fw: ACAGTTGCCATGTAGACC Rv: TTTTGGTTGAGCACAGG

Tabla 2. Secuencias de *primers* SYBR Green® usadas en los estudios de expresión génica de Sema 3A en las membranas sinoviales de los conejos en estudio. Pares de *primers* para Sema 3A y GAPDH como control endógeno.

1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media $\pm \sigma$. Se empleó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una corrección post-hoc para (el procedimiento de Dunn) para las comparaciones entre múltiples grupos, y la prueba de la U de Mann-Whitney para las comparaciones entre dos grupos. Cada extremidad se analizó como una muestra independiente para los estudios histológicos. Una $p < 0,05$ se consideró como significativo. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPadPrism V 5.01.

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.

2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

- **Tenofovir:** Sequoia Research Products (Carbosynth Limited, Berkshire, Reino Unido).
- **Péptidos recombinantes murinos M-CSF (Factor Estimulante de colonias de macrófagos) y RANKL:** R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.).
- **Xilacina:** (Rompun, Bayer, Kiel, Alemania).
- **Ketamina:** (Ketolar, Pfizer, Hameln, Alemania).
- **Medio de cultivo esencial modificado para osteoblastos y osteoclastos (α -MEM), suero bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomicina, anticuerpo anti-faloidina marcado con fluoróforo Alexa Fluor 555, anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo marcados con FITC (isocianato de fluoresceína):** Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.).
- **Dipiridamol, sal disódica fosfato de naphthol AS MX, reactivo de tinción Fast Green, sal de tinción Fast Red Violet LB, cetilperidinio, tampón de ensayo de radio-inmunoprecipitación, tampón para extracción de proteínas RIPA, cóctel inhibidor de proteasas, cóctel inhibidor de fosfatasas, calceína, reactivo de tinción rojo de alizarina, tetraborato de sodio, medio de montaje fluoroshield con DAPI para inmunofluorescencia, glutaraldehído, trihidrato de cacodilato sódico, ácido ascórbico, dexametasona, β -glicerofosfato:** Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **Acetato de sodio, ácido acético glacial, tartrato de sodio, Triton X-100, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hematoxilina, eosina, reactivo de tinción azul de toluidina, tinción tricrómica de Masson:** Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EE.UU.).
- **Kit de ASB para cuantificación de proteínas, cámara de cultivo sobre portaobjetos (Lab-Tek II chamber slide, 8 pocillos) y kit de extracción de proteínas citoplasma/núcleo (NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents), kit A22066 para cuantificación de ATP, medio de congelación NEG-OCT:** ThermoFisher Scientific (Rockford, IL, EE.UU.).
- **Anticuerpos secundarios de conejo y ratón HRP de hospedador caprino, Amersham Imager 600:** GE Healthcare (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.).

- **Anticuerpos primarios para pERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38, pJNK, JNK, β -catenina total, p-Ser552- β catenina y non-p- β catenina (Ser33/37/Thr41), p50/p105 NF κ B, I κ B α y p-I κ B α :** Cell Signaling (Werfen, L'Hospitalet de Llobregat, España).
- **Anticuerpos primarios para β -actina, histona H3, catepsina K, CD68, RANKL, OPG y FA:** Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE.UU.).
- **Tetrahidroclorato de 3,3 diaminobencidina:** Dako (Camarillo, CA, EE.UU.).
- **Medio de montaje DPX:** VWR International (Leuven, Bélgica).
- **Kit de extracción de ARN total E.Z.N.A.:** Omega Bio-Tek (VWR International, Norcross, GA, EE. UU.).
- **Kit de PCR MuLV transcriptasa inversa, inhibidor de ARNasa, hexámeros aleatorios, MgCl₂, PCR buffer II, y dNTPs, Power UP SYBR Green MasterMix:** Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.).
- **Software Quantity One, kit de membranas de nitrocelulosa, almohadillas y solución tampón de transferencia:** BioRad (Berkeley, CA, EE.UU.).
- **Discos de dentina:** Inmunodiagnóstico Systems (Scottsdale, AZ, EE. UU.).
- **Luminata Crescendo™ Western HRP Detection, kits MILLIPLEX MAP Magnetic Beads:** Merck Millipore (Billerica, MA, EE.UU.)
- **Ratones C57Bl/6 WT:** Janvier Labs (Laval, France).
- **Ratones C57Bl/6 A_{2A} KO:** los ratones fueron donados por el laboratorio del Dr. Bruce Cronstein (Facultad de Medicina de la Universidad de New York, NYU Lagone Health, NY, EE.UU.). Su procedencia inicial es el laboratorio del Dr. Jiang-Fan Chen (Escuela de Medicina de la Universidad de Boston, Boston, MA, EE.UU.).
- **Cauterizador eléctrico:** FIAB SpA (Vicchio, Florencia, Italia).
- **Microscopio Leica DMD108, software Leica LAS EZ, Micrótopo HM 325 Rotary Microtome, criostato Leica CM1900, microscopio Leica SCN4000:** Leica, Microsystems Inc. (Buffalo Grove, Illinois, EE.UU.).
- **SigmaScan Pro5:** Systat Software (San José, CA, EE. UU.).
- **Microscopio de fluorescencia, software Act1:** Nikon (Melville, NY, EE.UU.).
- **ADVIA 2400:** Siemens Healthcare S.L.U. (Madrid, España).
- **Skyscan 1172mCT, software NRECON, software CTAn, software CTVox:** Bruker (Kontich, Bélgica).

2.2. ESTUDIOS IN VITRO EN OSTEOCLASTOS

2.2.1. Diferenciación de osteoclastos en cultivo.

Se aislaron células de médula ósea murinas (BMC) procedentes de ratones hembra (ratonas, a partir de ahora) C57Bl/6 de edad comprendida entre 6-8 semanas siguiendo la metodología descrita por Mediero y colaboradores [118]. A modo de resumen: una vez diseccionados tanto el fémur como la tibia (manteniendo intactos los cóndilos femorales y platos tibiales de la articulación y los cóndilos femorales de unión a la cadera, para conservar el interior aséptico) se extrajo la médula de la cavidad ósea al cortar los extremos y lavar por perfusión (con jeringa y aguja de 27G en esterilidad) con medio de cultivo α -MEM [que contiene 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de penicilina/estreptomicina, a partir de ahora denominado α -MEM completo]. Se incubó toda la noche para separar los precursores hematopoyéticos (no adherentes) de los mesenquimales (adherentes). Recogimos los precursores hematoyéticos y estos se sembraron a una densidad de 200.000 células/pocillo (en placa p48) en medio de cultivo α -MEM completo, enriquecido con 30 ng/ml de M-CSF durante 2 días para su diferenciación a macrófagos. Al tercer día de cultivo (día 0 de diferenciación), se les administró a las células 30 ng/ml de RANKL (junto a los 30 ng/ml de M-CSF) para inducir diferenciación a osteoclastos y se comenzaron a tratar con tenofovir en dosis seriadas (10 μ M a 1 nM) solo o en combinación con dipiridamol a dosis seriadas (10 μ M a 1 nM). El medio de cultivo y los tratamientos se cambiaron y administraron, respectivamente, cada dos días.

Después de la incubación durante 7 días con los correspondientes tratamientos, las células se tiñeron para determinar la actividad fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y cuantificar los osteoclastos maduros presentes. Se contaron como positivas para la tinción TRAP aquellas células con 3 o más núcleos. El protocolo seguido es el descrito en el apartado 1.3.2, incubando las células en el tampón de TRAP durante 10 minutos. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.2.2. Determinación de los niveles extracelulares de ATP en el sobrenadante de osteoclastos tras el tratamiento con tenofovir.

Los niveles de ATP extracelulares se determinaron en células BMCs aisladas como se define en el apartado 2.2.1. Las células (200.000 por pocillo en placas p48) se trataron con 30

ng/ml M-CSF durante 48h. Posteriormente se trataron con 30ng/ml de RANKL y dosis seriadas de tenofovir (10 μ M a 1 nM) durante 24 horas. Para cuantificar los niveles de ATP se empleó un ensayo bioluminiscente en el cual la generación de ATP es dependiente de la luz acoplada luciferasa recombinante y su sustrato D-luciferina. Se realizó el experimento siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todos los ensayos se hicieron por triplicado, utilizando probenecid 1mM como control positivo.

2.2.3. Estudio *knockdown* de transportadores de ATP y receptor A_{2A} de adenosina *in vitro*.

Células RAW264.7 (línea celular de tipo monocito/macrófago, que se originan a partir de la línea celular transformada por el virus de la leucemia de Abelson derivada de ratones BALB/c) fueron sembradas en placa a una confluencia de 15.000 células/ml. Tras 24 horas, las células fueron tratadas con bromuro de hexadimetrina (4 mg/mL) y 10⁸ partículas de transducción lentiviral correspondiente a panexina-1 (SHCLNV-NM_019482), conexina 43 (SHCLNV-NM_010288.3) y el receptor A_{2A} (SHCLNV-NM_009630) de ratón. Al mismo tiempo, se administró puromicina como marcador de selección durante otras 24 horas para permitir la transfección. Tras este periodo, se reemplazaron los medios con α -MEM completo enriquecido con puromicina (1 mg/ml), cambiándose el medio cada 3 días hasta el final del procedimiento. Una vez formados los clones, se aislaron y expandieron hasta confluencia. Se utilizó un scrambled shRNA (SHC002V) como control. En todos los casos, las células se mantuvieron en la estufa de cultivos a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad.

Para ensayar la diferenciación de osteoclastos, se sembraron 200.000 células transfectadas/pocillo (placa 48 pocillos) con medio α -MEM completo con puromicina, y se diferenciaron con 50 ng/ml de RANKL durante 4 días en presencia de tenofovir 1 μ M, dipiridamol 1 μ M y la combinación de ambos en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Se realizó la tinción de TRAP de la misma manera que la descrita en el apartado anterior. Se realizaron 3 experimentos independientes.

Para ensayar la actividad de resorción ósea, 200.000 células transfectadas/pocillo se sembraron en las mismas condiciones que las descritas en el párrafo anterior. Después de 4 días de diferenciación, se estudió la resorción tiñendo los discos de dentina con el reactivo azul de toluidina al 1% en 0,5% de tetraborato sódico, tras fijarlas con 4% de glutaraldehído en cacodilato sódico 0,2 M (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Los surcos de

resorción producidos por los osteoclastos se tiñeron con color azul púrpura característico. Las imágenes se tomaron con microscopio Leica DMD108 y digitalizadas con el software Leica LAS EZ. En todos los casos, las células se mantuvieron en la estufa de cultivos a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Se realizaron 2 experimentos independientes.

2.2.4. Estudio de expresión génica de marcadores de remodelado óseo en osteoclastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol mediante RT-PCR cuantitativa.

Para validar el efecto de tenofovir en la diferenciación de osteoclastos, estudiamos la expresión en estas células de marcadores de remodelado óseo importantes en la regulación del metabolismo del hueso. Los marcadores fueron analizados por RT-PCR. Las células fueron cultivadas como se describe en el apartado 2.2.1 en presencia de tenofovir 1 μM o dipiridamol 1 μM, o en combinación con ambos. Para este estudio se analizaron: catepsina K, NFATc1 (Factor nuclear de células T activadas, citoplásmico 1) y osteopontina (OPN) (**Tabla 3**).

GEN	SECUENCIA DE LOS PRIMERS
<i>CATEPSINA K</i>	Fw: GCTGAACTCAGGACCTCTGG Rv: GAAAAGGGAGGCATGAATGA
<i>NFATc1</i>	Fw: TCATCCTGTCCAACACCAAA Rv: TCACCCTGGTGTCTTCTCCTC
<i>OPN</i>	Fw: TCTGATGAGACCGTCACTGC Rv: TCTCCTGGCTCTCTTTGGAA
<i>RANKL</i>	Fw: AGCCGAGACTACGGCAAGTA Rv: GCGCTCGAAAGTACAGGAAC
<i>OPG</i>	Fw: CTGCCTGGGAAGAAGATCAG Rv: TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC
<i>GAPDH</i>	Fw: CTACACTGAGGACCAGTTGTCT Rv: GGTCTGGGATGGAAATTGTG

Tabla 3. Secuencias de *primers* SYBR Green® usadas en los estudios de expresión de marcadores óseos. NFATc1, OPN, RANKL, OPG y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Las muestras de osteoclastos se recogieron a los 0, 3 y 7 días de diferenciación. El ARN total se extrajo utilizando kit de extracción de ARN total E.Z.N.A. siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, el ARN total se retrotranscribió utilizando el kit de PCR MuLV transcriptasa inversa en concentración de 2,5 U/μl, incluyendo en la reacción los siguientes reactivos: inhibidor de ARNasa 1 U/μl, hexámeros aleatorios 2,5 U/μl, MgCl₂ 5 mM, PCR buffer II 1X, y dNTPs 1 mM. La cuantificación relativa de la expresión génica fue realizada utilizando

RT-PCR en tiempo real con Step One Plus y empleando Power UP SYBR Green MasterMix según el protocolo del fabricante. Los *primers* utilizados en la amplificación por PCR en tiempo real se detallan en la tabla. Se utilizó el método Pfaffl [138] para la cuantificación relativa. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.2.5. Estudio de las rutas de activación de MAPKs y NFκB en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol en osteoclastos murinos.

Los precursores de osteoclastos murinos se trataron con tenofovir 1 μM, dipiridamol 1 μM, o una combinación de ambos, en presencia de M-CSF/RANKL (similar al cultivo y tratamiento descrito en el apartado 2.2.1). Los tratamientos se realizaron de la siguiente manera: se realizó un pre-tratamiento con dipiridamol 30 minutos antes de administrar la dosis de tenofovir y, por otro lado, también se realizaron experimentos con pre-tratamiento con tenofovir 30 minutos antes del tratamiento con la dosis determinada de dipiridamol. Una vez realizados los pre-tratamientos se incubaron las células con tenofovir, dipiridamol y la combinación de ambos. Tras el tiempo determinado para la incubación (5´ a 30´, 1 hora y 24 horas post-tratamiento), las células fueron lisadas con tampón de extracción de proteínas RIPA. Para la separación proteica de citoplasma y núcleo, las células se levantaron de la placa, y en el pellet de células se extrajeron las proteínas del citoplasma y del núcleo utilizando el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, siguiendo las instrucciones y protocolo del fabricante. Finalmente, se determinó la concentración de proteína utilizando ácido bicinonínico y curva patrón estándar de ASB.

Una vez cuantificada la proteína, 4 μg de la misma fueron sometidos a electroforesis en geles SDS-PAGE al 7,5% o 10% y transferidos posteriormente a una membrana de nitrocelulosa. Para evitar unión inespecífica de proteínas en la membrana, se bloqueó con solución de TBS con 0,05% de Tween-20 y 3% ASB, durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios a la concentración siguiente en TBS/Tween-20 0,05% y 3% ASB: pERK 1/2 1:1000, p-p38 1:1000, pJNK 1:500, p50/p105 NFκB 1:5000, IκBα 1:500, p-IκBα 1:500. Al día siguiente, tras 3 lavados en TBS/Tween-20 0,05%, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo HRP 1:5000 o anti-ratón HRP 1:5000. La visualización y revelado de las bandas de proteína por quimioluminiscencia se realizó empleando el equipo Amersham Imager 600 con el reactivo quimioluminiscente Luminata Crescendo™.

El control de carga de estas membranas se realizó revelando ERK1/2 1:1000, p38 1:1000, JNK o β -actina 1:5000. En el caso de la proteína extraída del núcleo, el control de carga se realizó con anticuerpo anti-histona H3, dilución 1:1000.

La cuantificación y análisis de expresión se realizó por densitométrica digital con el software Quantity One, y haciendo normalización con la intensidad de banda del control de carga: ERK1/2, p38, JNK, β -actina, o histona H3, según corresponda. Las variaciones en intensidad de expresión fueron determinadas como un porcentaje con respecto al control no tratado y expresado como la media \pm EEM. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.3. ESTUDIOS IN VITRO EN OSTEOLASTOS

2.3.1. Diferenciación de osteoblastos.

Siguiendo el protocolo descrito para la extracción de médula ósea (apartado 2.2.1), los precursores mesenquimales extraídos de células adherentes, se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/cm² con medio α -MEM completo. Una vez confluentes, las células se trataron con medio osteogénico: α -MEM completo enriquecido con dexametasona 1 mM, 50 mg/ml de ácido ascórbico y β -glicerofosfato 10 mM. Las células fueron tratadas con tenofovir en dosis seriadas (10 μ M a 1 nM) solo o en combinación con dipiridamol en dosis seriadas (10 μ M a 1 nM). Tras 14 días de cultivo en diferenciación, los osteoblastos ya maduros se tiñeron, previa fijación con 4% de formaldehído, con el reactivo colorante rojo de alizarina al 2% durante 45 minutos. Posteriormente se eluyó el colorante con cetilperidinio al 10% durante 1 hora en agitación y se midió la absorbancia a 620 nm. La cuantificación de la tinción se realizó utilizando el software SigmaScan Pro5. En todos los experimentos, se añadió DMSO al medio de control. Las células se mantuvieron, igualmente, en la estufa de cultivos a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.3.2. Estudio de expresión génica de marcadores de remodelado óseo en osteoblastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol mediante RT-PCR cuantitativa.

Para validar el efecto de tenofovir y dipiridamol en la diferenciación de osteoblastos, estudiamos la expresión en estas células de marcadores de remodelado óseo importantes en

la regulación del metabolismo del hueso. Los marcadores fueron analizados por RT-PCR siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 2.2.4. Las células fueron cultivadas como se describe en el apartado 2.3.1 en presencia de tenofovir 1 μ M o dipiridamol 1 μ M, o en combinación con ambos. Para este estudio se analizaron: RANKL y OPG cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 3**. La expresión de estos marcadores se estudió a los 0, 7 y 14 días de diferenciación. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.3.3. Estudio de la activación de β -catenina en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol en osteoblastos murinos.

Los precursores mesenquimales murinos se trataron con tenofovir 1 μ M, dipiridamol 1 μ M, o una combinación de ambos, en medio de cultivo osteogénicos (α -MEM completo enriquecido con dexametasona 1 mM, 50 mg/ml de ácido ascórbico y β -glicerofosfato 10 mM). Extraída y cuantificada la proteína como se describe en el apartado 2.2.5, procedimos a analizar por western blot la expresión de: β -catenina total, non-p- β -catenina (Ser33/37/Thr41) y p-Ser552- β -catenina; todos ellos a dilución 1:1000. La visualización y revelado de las bandas de proteína por quimioluminiscencia se realizó empleando el equipo Amersham Imager 600. El control de carga de estas membranas se realizó incubando y revelando β -actina a dilución 1:1000.

Las variaciones en intensidad de expresión fueron determinadas como un porcentaje con respecto al control no tratado y expresado como la media \pm EEM. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.3.4. Estudio de translocación al núcleo de β -catenina en osteoblastos murinos en presencia/ausencia de tenofovir/dipiridamol.

Para identificar la activación y translocación nuclear de β -catenina, los precursores mesenquimales de médula ósea se sembraron en sistema de cámara de cultivo sobre portaobjetos y se trataron con medio osteogénico (α -MEM completo enriquecido con dexametasona 1 mM, 50 mg/ml de ácido ascórbico y β -glicerofosfato 10 mM) en presencia de tenofovir 1 μ M y dipiridamol 1 μ M, o en combinación de ambos. Finalizado el tratamiento (15 minutos), se procedió a la fijación celular con 4% de formaldehído frío durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces con PBS y un último lavado con PBS/ASB 3% y se procedió a bloquear unión inespecífica de anticuerpo con PBS/ASB 3%, Triton X-100 0,5% y SBF 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: β -catenina total (1:200), non-p- β -catenina (Ser33/37/Thr41, 1:200) y p-Ser552- β -catenina (1:200). Para la incubación con el anticuerpo secundario, procedimos previamente al lavado de las células con PBS/ASB 3% e incubamos con el anticuerpo secundario de IgG anti-conejo con el fluoróforo FITC acoplado, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de los lavados con PBS tras incubación con el secundario, las células se montaron con medio de montaje Fluoroshield que incluía el contraste con DAPI. Finalmente, las imágenes fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia equipado con el software Act1. Se realizaron 5 experimentos independientes.

2.4. EXPERIMENTOS IN VIVO

2.4.1. Determinación de la dosis de tenofovir en el modelo animal murino.

La determinación de la dosis de tenofovir y dipiridamol en los tratamientos del modelo animal murino se realizó mediante conversión de la dosis equivalente con respecto a la dosis establecida y permitida en pacientes humanos [108, 139].

2.4.2. Modelo animal en ratones macho C57Bl/6 *wild type* y A_{2A}KO.

Todos los ensayos experimentales con animales siguieron protocolos aprobados cumpliendo con la legislación de protección y uso de animales de experimentación en España. Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del IIS-Fundación Jiménez Díaz y la Consejería de Agricultura y Pesca de la Comunidad de Madrid, con número PROEX 16/078.

Los ratones C57Bl/6 macho de 6-8 semanas de edad y sus congéneres A_{2A}KO (A_{2A}KO, en adelante) se dividieron en cuatro grupos de estudio: control con solución salina 0,9% (N=10 para *wild type*, N=8 para A_{2A}KO), tenofovir 75 mg/kg/día (N=10 para *wild type*, N=8 para A_{2A}KO), dipiridamol 25 mg/kg/día (N=9 para *wild type*, N=8 para A_{2A}KO), combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día (N=9 para *wild type*, N=8 para A_{2A}KO) (**Fig.**

12). El tratamiento se basó en una inyección diaria de tenofovir por vía subcutánea y dipiridamol por vía intraperitoneal durante 4 semanas. Los ratones fueron pesados semanalmente hasta su sacrificio. Durante todo el estudio, los animales fueron provistos de agua y alimento *ad libitum* hasta la eutanasia. Transcurridas las 4 semanas de tratamiento, se procedió a la eutanasia de los ratones en cámara de CO₂.

Se diseccionaron los huesos largos (fémur y tibia, manteniendo intacta su estructura) y se fijaron con formaldehído al 4% durante 48 horas. Una de las extremidades se destinó para realizar estudio de micro-arquitectura ósea mediante microCT y la otra extremidad para estudio histológico (cortes en parafina).

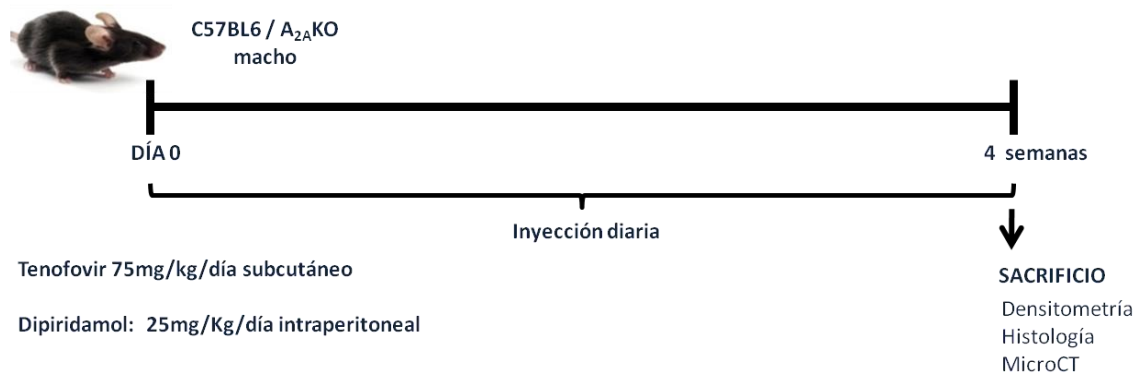


Figura 12. Cronograma del modelo animal murino C57Bl/6 macho C57Bl/6 WT y A2AKO. Los ratones se trataron diariamente durante 4 semanas con 75 mg/kg/día (vía subcutánea) de tenofovir y 25 mg/kg/día (vía intraperitoneal) de dipiridamol. Tras las 4 semanas se extrajeron los huesos largos (fémur-tibia) para su análisis.

2.4.3. Modelo animal en ratonas C57Bl/6 *wild type* y A_{2A}KO ovariectomizadas (OVX).

De igual modo, ratonas C57Bl/6 de 10-12 semanas de edad y sus congéneres A_{2A}KO, fueron manipuladas quirúrgicamente para realizarles ovariectomías (OVX) con cauterizador eléctrico. Las ratonas se dividieron en los cinco siguientes grupos: sham (N=5 para *wild type*, N=4 para A_{2A}KO), control con solución salina 0,9% (N=10 para *wild type*, N=3 para A_{2A}KO), tenofovir 75 mg/kg/día (N=10 para *wild type*, N=2 para A_{2A}KO), dipiridamol 25 mg/kg/día (N=10 para *wild type*, N=4 para A_{2A}KO), combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día (N=10 para *wild type*, N=4 para A_{2A}KO) (**Fig. 13**). El tratamiento se llevó a cabo de manera que administramos una inyección diaria de tenofovir por vía subcutánea y dipiridamol por vía intraperitoneal durante 5 semanas. Las ratonas fueron pesadas semanalmente hasta el

momento de la eutanasia. Durante todo el estudio los animales fueron provistos de agua y alimentos *ad libitum* hasta la eutanasia. Transcurridas las 5 semanas de tratamiento, las ratonas se sometieron a eutanasia en cámara de CO₂. Los huesos largos fueron extraídos, fijados y preparados para microCT y estudio histológico, al igual que se hizo en el estudio de los ratones macho.

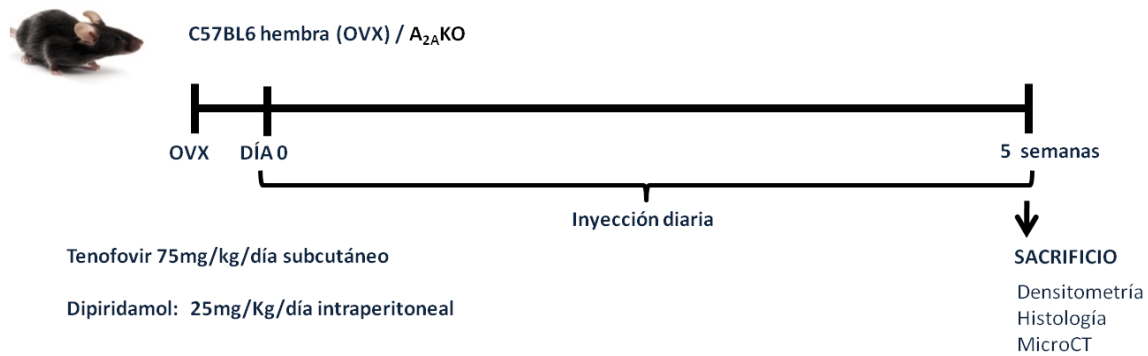


Figura 13. Cronograma modelo animal murino C57Bl/6 hembra (OVX) WT y A2AKO. Las ratonas se trataron diariamente durante 5 semanas con 75 mg/kg/día (vía subcutánea) de tenofovir y 25 mg/kg/día (vía intraperitoneal) de dipiridamol. Tras las 5 semanas se extrajeron los huesos largos (fémur-tibia) para su análisis.

2.4.4. Análisis de densidad mineral ósea (DMO) en ratones mediante desitometría (DEXA).

Al finalizar el modelo animal (4 semanas para los machos y 5 para las hembras) Se evaluó la DMO (g/cm³) de todo el esqueleto completo de los ratones (tanto machos como hembras, *wild type* y A_{2A}KO) mediante DEXA adaptada al roedor con el equipo PIXImus (Lunar; Madison, WI, EE. UU.). El instrumento se calibró antes de cada sesión de escaneo, usando un soporte que simulaba el cuerpo y volumen del ratón y con una DMO conocida, de acuerdo con las directrices y protocolo del fabricante. Los animales eran anestesiados con ketamina/xilacina y colocados en posición prona en la superficie de escaneo para analizar todo su esqueleto.

2.4.5. Análisis de la micro-arquitectura estructural del hueso mediante microtomografía computarizada (microCT).

Después del sacrificio, y tras fijación del tejido en formaldehído al 4%, unas de las extremidades; y más concretamente el fémur, se fijó en etanol al 70% y se prepararon para

estudio de microCT como anteriormente documentaron Mediero y colaboradores [140]. Para el modelo de ratones macho las muestras se distribuyeron por grupos del siguiente modo: modelo *wild type* (N= 7 control, N= 7 tenofovir, N= 6 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol), modelo A_{2A}KO (N= 5 control, N= 6 tenofovir, N= 5 dipiridamol, N= 5 tenofovir + dipiridamol).

Por su parte el modelo de ratonas OVX se distribuyó como sigue: modelo *wild type* (N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 7 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol), modelo A_{2A}KO (N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol).

Para el análisis morfométrico de la zona media del fémur se utilizó el equipo Skyscan 1172mCT (NYU School of Dentistry, NY, EE.UU) asignando los siguientes parámetros de imagen: 60 kV, 167 uA, tamaño de píxel de 9,7 micrones, matriz de 2000 x 1332, rotación de 0,3 grados, seis promedios, movimiento de corrección de 10, filtro Al de 0,5 mm. Las imágenes fueron reconstruidas utilizando el software Skyscan NRECON (rango de histograma de 0 a 0,085, corrección de endurecimiento del haz de 40, suavizado gaussiano (factor 1), anillo de corrección de artefactos de 8). Para los correspondientes análisis cuantitativos de parámetros óseos tanto corticales como trabeculares, se analizaron secciones transversales de fémur utilizando el software CTAn (Skyscan) y posteriormente se reconstruyeron las imágenes en 3D con el software CTVox (Skyscan).

2.4.6. Estudio histológico de marcadores de remodelado óseo en los huesos largos de los ratones.

Los huesos largos extraídos y destinados para el estudio histológico se fijaron en formaldehído al 4% durante 48 horas, seguido de descalcificación en EDTA al 10% durante 4 semanas e inclusión en parafina. Se realizaron secciones de 5 µm en micrótomos (Leica HM 325 Rotary Micrótomos; Leica, Microsystems, Inc. Buffalo Grove, Illinois, EE.UU.). Para el modelo de ratones macho las muestras se distribuyeron por grupos del siguiente modo: modelo *wild type* (N= 10 control, N= 10 tenofovir, N= 9 dipiridamol, N= 9 tenofovir + dipiridamol); modelo A_{2A}KO (N= 8 control, N= 8 tenofovir, N= 8 dipiridamol, N= 8 tenofovir + dipiridamol). Por su parte el modelo de ratonas OVX se distribuyó como sigue: modelo *wild type* (N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 7 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol), modelo A_{2A}KO (N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol).

INMUNOFLUORESCENCIA PARA CATEPSINA K, CD68, RANKL, OPG Y FOSFATASA ALCALINA (FA).

El análisis por inmunofluorescencia se realizó siguiendo el protocolo habitual que se detalla a continuación: las secciones desparafinadas e hidratadas fueron incubada con solución de proteinasa K (20 mg/ml en tampón TE, pH 8,0) durante 12 minutos en baño de agua a 37 °C para la recuperación de antígeno. Tras ello, se procedió al bloqueo de la unión no específica con PBS/ASB 3% y 0,1% Triton X-100 durante 1 hora. Finalmente se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios anti-catepsina K en dilución 1:50 y anti-CD68, RANKL, OPG y FA en dilución 1:200. Se incubaron durante toda la noche a 4 °C en una cámara de humidificación. Al día siguiente, siguiendo el protocolo, se procedió al lavado de los cortes con PBS y posteriormente a la incubación con el anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-ratón conjugado con el fluoróforo FITC a concentración 1:200) durante 1 hora en oscuridad. Los portaobjetos se montaron con medio de montaje *Fluoroshield*/DAPI (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) y se realizaron fotografías en regiones específicas de interés con el microscopio de fluorescencia (Nikon) equipado con el software Act1.

HISTOQUÍMICA PARA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD TRAP EN OSTEOCLASTOS.

La histoquímica para medir la actividad TRAP específica en osteoclastos se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.3.2.

2.4.7. Evaluación de la fosfatemia y del grosor del osteoide en los ratones *wild type*.

Para estudiar si los ratones padecían de la hipofosfatemia típica vista en pacientes VIH provocada por la terapia con tenofovir y para comprobar cómo esta hipofosfatemia podría estar afectando al grosor y calidad del osteoide, se estudiaron tanto los niveles de fósforo sérico como el grosor de osteoide en los huesos largos de los ratones.

Tras el tratamiento y antes de la eutanasia, se extrajo sangre de los ratones (tanto machos como hembras OVX *wild type*). Se procesó el suero de los animales para la medida de los niveles de fósforo sérico. Para llevar a cabo este análisis se usó la tecnología del sistema de análisis clínicos en cadena ADVIA 2400 (N=5 ratones por grupo para ambos modelos *wild type*).

Por otro lado, los fémures de los ratones macho y ratonas OVX *wild type* (N=5 ratones por grupo para cada tratamiento en ambos modelos) se fijaron en formaldehído al 4% durante 48 horas y seguidamente se conservaron a 4 °C de forma seriada en soluciones al 15% y 30%

de sacarosa, durante 24 horas cada una de ellas. Tras el procesamiento en las soluciones de sacarosa, los huesos se incluyeron en medio NEG-OCT sometiéndolos a congelación en isopentano enfriado con hielo seco, cuidadosamente y de manera progresiva para no dañar el tejido. Una vez incluido el tejido, se realizaron secciones de 10 µm en criostato. Los cortes histológicos se tiñeron con tinción tricrómica de Masson y se escanearon con microscopio de Leica SCN 4000.

2.5. ESTUDIO PROSPECTIVO EN PACIENTES CON VIH

2.5.1. Diseño del estudio, criterios de inclusión y aspectos éticos.

Estudio prospectivo realizado en una cohorte de 110 pacientes, menores de 50 años (18-50 años de edad), con diagnóstico reciente de VIH (pacientes *naïve*). Los pacientes fueron separados por tratamiento: tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (n= 21), tenofovir alafenamida (TAF) (n= 22), abacavir (n= 39), inhibidor de la proteasa (n= 12) y pacientes que cambiaron de tratamiento durante el estudio (n= 16). El reclutamiento se realizó entre mayo de 2016 y septiembre de 2017, en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos los pacientes firmaron el consentimiento previo antes de ser incluidos en el estudio. Estos pacientes fueron observados durante las 48 semanas posteriores al inicio del tratamiento. Evaluamos los parámetros inmunológicos y metabólicos óseos en 0, 3 y 12 meses y DEXA al inicio del estudio y después de 12 meses de tratamiento. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética y de Investigación Clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y la Declaración de Helsinki.

2.5.2. Análisis y parámetros de estudio en la cohorte de pacientes.

Se evaluaron aspectos epidemiológicos como edad, raza y país de origen. Así mismo, se le hizo a los pacientes el correspondiente cuestionario sobre hábitos de estilo de vida como: consumo de alcohol, tabaco y drogas, ejercicio y la ingesta de lácteos y suplemento con vitamina D; y se calculó el índice de masa corporal (IMC).

Para hacer el correspondiente seguimiento del paciente, se les realizó su análisis clínico de sangre antes del inicio del tratamiento, a los 3 meses y al año del comienzo de la terapia antirretroviral. Se midieron los parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con

el metabolismo fosfo-cálcico (calcio, fósforo, vitamina D, parathormona, hormona tiroidea, osteocalcina, telopéptido carboxilo terminal de colágeno tipo I (CTX) y propéptido amino-terminal procolágeno tipo 1 (P1NP)) y la función renal. Para estudiar el estado viral del paciente, se realizaron los correspondientes análisis de parámetros inmunológicos tales como linfocitos CD4+, CD8+ y carga viral de VIH-1. Al inicio del tratamiento y al año se realizaron escaneos DEXA de cadera y columna vertebral (absorciometría dual de rayos X). La osteopenia y la OP se consideraron de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

2.5.3. Medida de marcadores de remodelado óseo en el plasma de pacientes VIH: basal, 3 y 12 meses.

De la cohorte de 110 pacientes con VIH que reunimos, hicimos estudio en plasma de los niveles de osteocalcina, telopéptido carboxilo terminal de colágeno tipo I (CTX) y propéptido amino-terminal procolágeno tipo 1 (P1NP). De forma paralela a la analítica de bioquímica, se realizó el análisis y estudio de los siguientes parámetros de remodelado óseo: DKK-1 (Dickkopf-1), OPG (osteoprotegerina), OPN (osteopontina), SOST (esclerostina), PTH (hormona paratiroidea), FGF-23 (factor de crecimiento fibroblástico 23) y RANKL. Para llevar a cabo este análisis, utilizamos los kits *MILLIPLEX MAP Human Bone Magnetic Bead* y los kits *MILLIPLEX MAP Human RANKL Magnetic Bead-Single Plex*. Utilizando las instrucciones del fabricante, las muestras de plasma y los estándares y los controles de calidad se analizaron por duplicado. Los límites de detección fueron los siguientes: DKK-1, 5 pg/ml; OPG, 7 pg/ml; OPN, 98 pg/ml; SOST, 24 pg/ml; PTH, 5 pg/ml; FGF-23, 37 pg/ml y RANKL, 4,88 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo para los marcadores óseos estudiados fueron inferiores al 10%; Los coeficientes de variación inter-análisis fueron inferiores al 15% para ambos kits multiplex. Los kits se analizaron y cuantificaron mediante la tecnología LUMINEX MAGPIX® (Illumina Corporation; Austin, TX, EE.UU.).

2.5.4. Medida de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el plasma de pacientes VIH: basal, 3 y 12 meses.

De forma paralela, realizamos el estudio de citoquinas pro-inflamatorias [IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12 (p70), INF γ (interferón gamma), GM-CSF (factor estimulante de colonias de

granulocitos y macrófagos), IL-6, IL-7, IL-2] y anti-inflamatorias [IL-10, IL-13, IL-4, IL-5] en el plasma de los paciente con VIH. Para ello se utilizaron los kits *Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead*. Utilizando las instrucciones del fabricante, las muestras de plasma y los estándares y los controles de calidad se analizaron por duplicado. Los límites de detección para las citoquinas fueron los siguientes: GM-CSF, 0,6 pg/ml; INF γ , 0,94 pg/ml; IL-10, 0,93 pg/ml; IL-12 (p70), 0,27 pg/ml; IL-13, 0,34 pg/ml; IL-1 β , 0,24 pg/ml; IL-2, 0,30 pg/ml; IL-4, 1,84 pg/ml; IL-5, 0,22 pg/ml; IL-6, 0,17 pg/ml; IL-7, 0,6 pg/ml; IL-8, 0,25 pg/ml y TNF- α , 0,21 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo para el panel de citoquinas estudiadas fueron inferiores al 5%; Los coeficientes de variación inter-análisis fueron inferiores al 15%. Los kits se analizaron y cuantificaron mediante la tecnología LUMINEX MAGPIX® (Illumina Corporation; Austin, TX, EE.UU.).

2.5.5. Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas significativas en los datos entre grupos fueron determinadas por método ANOVA de una vía y Bonferroni post-test o prueba de la t de Student, según corresponda. Todas las estadísticas fueron calculadas utilizando el software GraphPad (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). En el caso de los datos de pacientes, estos se describen como cambios porcentuales en los diferentes grupos de tratamiento. Los cambios se expresan mediante la mediana y los cuartiles (percentiles del 25% y del 75%) y se comparan mediante la prueba de rangos de Wilcoxon.

RESULTADOS

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.

1.1. RESULTADOS IN VIVO.

1.1.1. El estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica (MQ) en la articulación, mejora la pérdida de hueso cortical subcondral relacionada con la artrosis en conejos.

Durante todo el modelo animal, los conejos se pesaron semanalmente. Se observó que los conejos intervenidos quirúrgicamente para generar la OA, sufrieron una pequeña disminución de su peso con respecto a los controles sanos (Fig. 14). Esta disminución no fue significativa, pero se mantuvo hasta el final del estudio, momento en el cual sí que alcanzó significación.

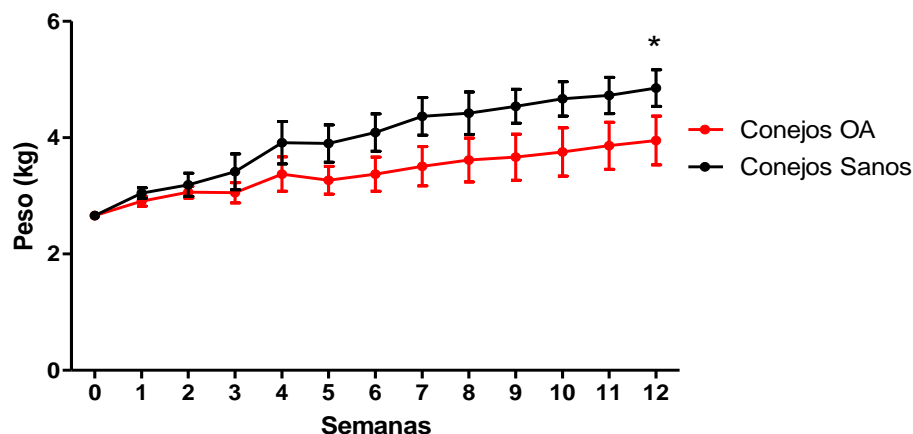


Figura 14. Representación gráfica de la evolución de los pesos de los conejos a lo largo del modelo. Una vez por semana, y previo a la realización de la MQ correspondiente, los animales fueron pesados. Los valores son media \pm σ (n Controles sanos= 3, n OA= 10). * $p < 0,05$ vs OA. Los valores de p se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney.

Para determinar la pérdida mineral ósea que caracteriza la enfermedad de la OA [6], se estudió el hueso cortical subcondral en toda la placa tibial mediante microCT (Fig. 15 A-B).

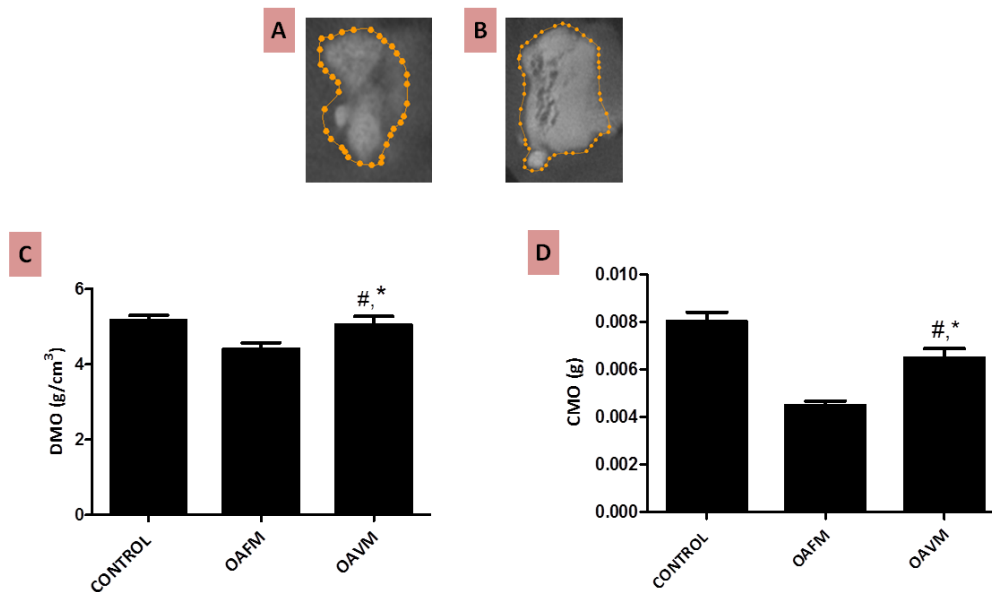


Figura 15. Imágenes representativas del estudio realizado por microCT en hueso cortical subcondral de la placa tibial completa. (A-B) Imágenes representativas de los límites utilizados por el estudio de la densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO), desde la aparición del hueso cortical (A), hasta la visualización de las primeras trabéculas (B). **(C-D)** Representación gráfica de los valores correspondientes a la DMO y CMO del análisis completo del plato tibial completo. Los valores son media $\pm \sigma$ (n Control = 6, n OAFM= 10 y n OAVM = 10). # p <0,05 vs Control ; * p <0,05 vs OAFM. Los valores de p se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney.

En las tibias de conejos artrósicos que recibieron falsa MQ (OAFM, en adelante), la DMO fue menor que en los conejos sanos (**Fig. 15 C**) (**Tabla 4**). Sin embargo, cuando se analizó la DMO en el grupo de animales que recibieron verdadera MQ (OAVM, en adelante) se comprobó que existía un incremento de la DMO con respecto a las extremidades del grupo OAFM, sin llegar a recuperarse los valores de DMO del grupo control (**Fig. 15 C**) (**Tabla 4**). En cuanto al contenido mineral óseo (CMO) se observó el mismo patrón descrito para la DMO (**Fig. 15 D**) (**Tabla 4**).

MicroCT HUESO CORTICAL SUBCONDAL (REGIÓN COMPLETA)			
PARÁMETROS	CONTROL (n=6)	OAFM (n=10)	OAVM (n=10)
DMO (g/cm³)	5,17 \pm 0,31	4,40 \pm 0,48 \$	5,05 \pm 0,61 *,\$
CMO (g)	0,0080 \pm 0,0010	0,0042 \pm 0,0018 \$	0,0062 \pm 0,0012 *,\$

Tabla 4. Cambios en los parámetros del hueso cortical subcondral en tibia proximal, medidos por microCT. Análisis por microCT de las metafisis de la tibias proximales de conejos sanos y artrósicos sometidos a una falsa o verdadera MQ (OAFM o OAVM, respectivamente). Los valores son media $\pm \sigma$. # p <0,05 vs Control; * p <0,05, vs OAFM. Los valores de p se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney.

Dada la diferente distribución anatómica de la carga mecánica sobre la rodilla en el conejo [133], acentuada por el mal alineamiento como consecuencia del desgaste tisular producido por la OA [141], quisimos valorar de modo independiente el daño producido por la sobrecarga heterogénea a nivel del hueso cortical subcondral en ambos platos tibiales (externo e interno) (Fig. 16 A-B).

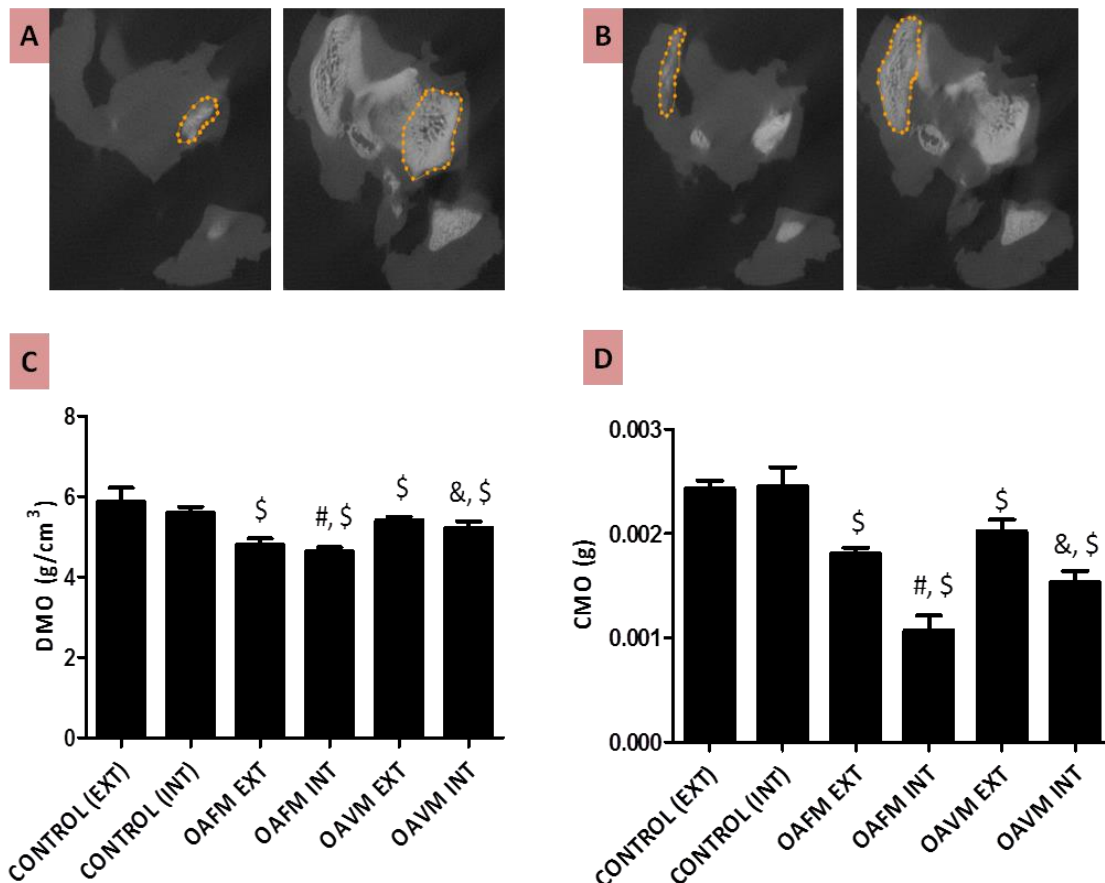


Figura 16. Imágenes representativas del estudio realizado por microCT en hueso cortical subcondral en placa tibial externa (A) e interna (B). (A-B) Imágenes representativas de los límites utilizados por el estudio de la densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO), desde la aparición del hueso cortical (A-B, imagen izquierda), hasta la visualización de las primeras trabéculas (A-B, imagen derecha). (C-D) Representación gráfica de los valores correspondientes a la DMO y CMO del análisis realizado independientemente en placas tibiales externa e interna. Los valores son media $\pm \sigma$ (n Control = 6, n OAFM= 10 y n OAVM = 10). \$ p < 0,05 vs Control; & p < 0,05 vs OAFM plato tibial interno; # p < 0,05 vs OAFM plato tibial externo. Los valores de p se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney. Para la comparación entre placa tibial externa e interna en una misma muestra se empleó el test de Wilcoxon.

En cuanto a la DMO, se observó en ambas placas tibiales (externa e interna), una disminución en los conejos artrósicos con respecto a los conejos sanos (Tabla 5), siendo este descenso significativamente mayor en las tibiae que recibieron la falsa MQ (hubo mayor

pérdida de DMO en la placa tibial interna con respecto a la externa en este grupo), en comparación con las que recibieron la verdadera manipulación (**Fig. 16 C**) (**Tabla 5**). El mismo fenómeno observado con la DMO se produjo en el caso del CMO. Se comprobó que el CMO se redujo significativamente en ambas placas tibiales, especialmente en la placa tibial interna del grupo OAFM (**Tabla 5**). En las tibias del grupo OAVM, hubo una disminución significativa en la pérdida de CMO tanto en la placa tibial externa como en la interna, sin llegar en ningún caso a recuperar los valores de los animales sanos (**Fig. 16 D**) (**Tabla 5**).

<i>MicroCT HUESO CORTICAL SUBCONDRA (PLACA TIBIAL EXTERNA E INTERNA)</i>						
<i>PARÁMETROS</i>	<i>CONTROL EXT (n=6)</i>	<i>CONTROL INT (n=10)</i>	<i>OAFM EXT (n=10)</i>	<i>OAFM INT (n=10)</i>	<i>OAVM EXT (n=10)</i>	<i>OAVM INT (n=10)</i>
<i>DMO (g/cm³)</i>	5,88 ± 0,77	5,61 ± 0,30	4,80 ± 0,37 \$	4,64 ± 0,27 \$	5,41 ± 0,22 #,\$	5,23 ± 0,39 *,\$
<i>CMO (g)</i>	0,0024 ± 0,0002	0,0025 ± 0,0005	0,0018 ± 0,0001 \$	0,0011 ± 0,0003 \$	0,0020 ± 0,0004 #,\$	0,0015 ± 0,0003 *,\$

Tabla 5. Cambios en los parámetros del hueso cortical subcondral en tibia proximal, medidos independientemente en ambas placas tibiales externa e interna por microCT. Análisis por microCT de las metafisis de las tibias proximales de conejos sanos y con OA sometidos a una falsa o verdadera MQ (OAFM o OAVM, respectivamente). Los valores son media ± σ. \$ p <0,05 vs Control; * p <0,03 vs OAFM en plato tibial interno; # p <0,05 vs OAFM en plato tibial externo. Los valores de p se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney. Para la comparación entre placa tibial externa e interna en una misma muestra se empleó el test de Wilcoxon.

1.1.2. La MQ mejora la arquitectura ósea del hueso trabecular subcondral en la tibia de los conejos artrósicos.

Tras los datos obtenidos por microCT de DMO y CMO, el siguiente objetivo fue explorar los cambios en la micro-arquitectura ósea asociados a la mejora descrita en el apartado anterior en relación con la masa ósea y la MQ. Así, mediante microCT se evaluaron varios parámetros del hueso trabecular subcondral en las tibias de los diferentes grupos estudiados (**Fig. 17 B-G**). El análisis del hueso trabecular subcondral se llevó a cabo en una región concreta de interés (ROI, *Region Of Interest*) delimitada objetivamente con coordenadas de ubicación similares para cada tibia (**Fig. 17 A**) [142-144].

De forma similar a lo observado previamente, se encontró que la DMO y el CMO se redujeron significativamente en los animales artrósicos, recuperándose parcialmente ambos parámetros con la manipulación (OAVM) (**Fig. 17 B-C**). Además, el índice BV/TV fue más reducido en las tibias de los conejos artrósicos (tanto OAFM como OAVM) (**Fig. 17 D**), en comparación con los conejos control sanos (**Tabla 6**), siendo esta disminución significativamente mayor en el grupo OAFM con respecto al grupo OAVM (**Fig. 17 D**).

Curiosamente el grosor de las trabéculas en el grupo OAVM fue significativamente más reducido que en las tibias del grupo OAVM (Fig. 17 E). Por otro lado, se encontró una disminución en el número de trabéculas en el grupo OAFM con respecto al grupo OAVM (Fig. 17 F), asociado a una mayor separación entre ellas (Fig. 17 G) (Tabla 6).

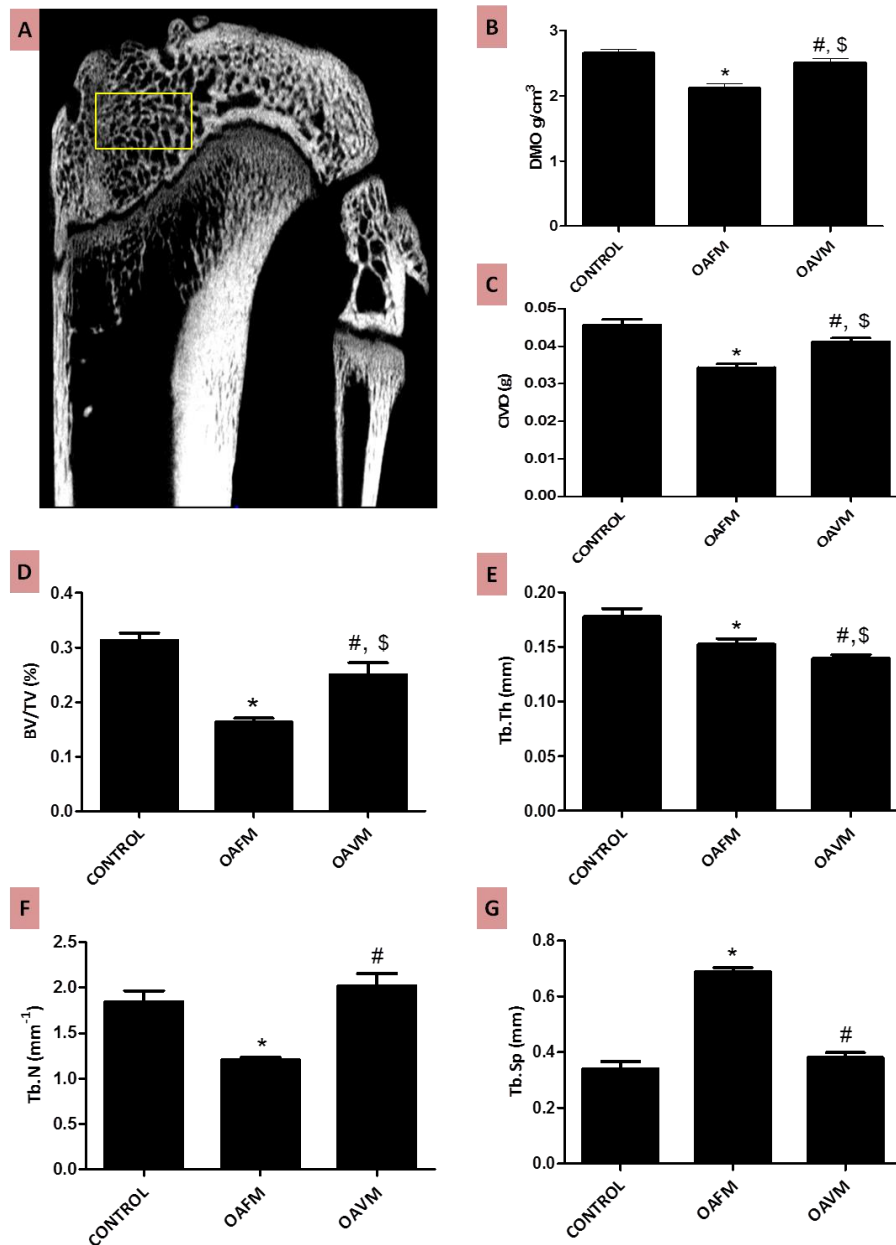


Figura 17. Parámetros analizados en hueso trabecular subcondral mediante microCT. (A) Imagen representativa del ROI (región de interés analizada) tibias utilizado y localizado en la región medial-proximal de la tibia que alberga la mayor carga mecánica articular. **(B)** Representación gráfica de la densidad mineral ósea (DMO). **(C)** Representación del contenido mineral óseo (CMO). **(D-G)** Representación gráfica de los diferentes parámetros de hueso trabecular subcondral analizados: **(D)** BV/TV (índice Volumen óseo/ volumen tisular), **(E)** Tb. Th (Grosor trabecular), **(F)** Tb. N (Número de trabéculas) y **(G)** Tb. Sp (Espaciado trabecular). Los valores son media $\pm \sigma$ (n Control = 6, n OAFM= 10 y n OAVM = 10). *, \$ p < 0,05 vs Control; #p < 0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

MicroCT HUESO TRABECULAR SUBCONDRA			
(REGIÓN DE INTERÉS, ROI)			
PARÁMETROS	CONTROL (n=6)	OAFM (n=10)	OAVM (n=10)
DMO (g/cm³)	2,65 ± 0,15	2,11 ± 0,19 \$	2,51 ± 0,20 *,\$
CMO (g)	0,046 ± 0,003	0,034 ± 0,003 \$	0,041 ± 0,003 *,\$
BV/TV (%)	0,3133 ± 0,0327	0,1631 ± 0,0222 \$	0,2502 ± 0,0537 *,\$
Tb. Th (mm)	0,1777 ± 0,0159	0,1522 ± 0,0164 \$	0,1395 ± 0,0106 *,\$
Tb. Sp (mm)	0,3198 ± 0,0460	0,6868 ± 0,0418 \$	0,3804 ± 0,0398 *,\$
Tb. N (mm⁻¹)	1,7865 ± 0,0806	1,206 ± 0,070 \$	2,020 ± 0,405 *

Tabla 6. Cambios en los parámetros del hueso trabecular subcondral en una región de interés (ROI) de tibia proximal medida por microCT. Análisis por microCT en una región específica de interés (ROI) de las metafisis de la tibia proximal de conejos sanos y artrósicos sometidos a una falsa o verdadera MQ (OAFM o OAVM, respectivamente). Los valores son media ± σ . \$ p < 0,05 vs Control; * p < 0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

1.1.3. Cambios en la modulación del remodelado óseo subcondral en las tibias de conejos artrósicos tras la MQ.

Los cambios descritos en el apartado anterior y la evidencia científica existente, demuestran que las alteraciones del hueso subcondral en la OA están íntimamente relacionadas con una des-regulación del sistema RANKL/OPG [32, 36]. Es por ello que se decidió estudiar este sistema en el modelo.

En el hueso subcondral de las tibias de los conejos artrósicos, se observó un aumento significativo en la expresión de RANKL con respecto a los conejos sanos. Este aumento fue significativamente menor en las articulaciones que recibieron MQ verdadera, en comparación con las que recibieron falsa manipulación (OAVM: 9,6 ± 0,48% área positiva vs OAFM: 17,5 ± 0,86% área positiva; p= 0,038) (Fig. 18 A).

Un patrón similar se encontró al analizar OPG. Así, el aumento de expresión encontrado en las tibias artrósicas no manipuladas fue parcialmente revertido con la verdadera manipulación (OAFM: 23,2 ± 0,93% área positiva vs OAVM: 11,8 ± 0,58% área positiva; p=0,013) (Fig. 18 B).

Al hacer el ratio RANKL/OPG para ver el balance final de la expresión de estas proteínas en el remodelado óseo [145], se observó un incremento significativo en el caso de las tibias que recibieron falsa MQ con respecto a las que recibieron verdadera manipulación. Estos resultados estarían sugiriendo un efecto de la MQ en el articulación en cuanto a la modulación de la acción resortiva osteoclástica en las tibias de los conejos con OA, favoreciendo así el anabolismo óseo (RANKL/OPG, OAFM: $1,26 \pm 0,57$ vs OAVM: $0,46 \pm 0,22$; $p=0,004$) (**Fig. 18 C**).

Los mismos resultados visto en hueso subcondral se observaron en cartílago. Se observó un aumento significativo de la expresión de RANKL en las tibias que recibieron falsa MQ con respecto a las que sí que la recibieron óseo (OAFM: $9,64 \pm 0,43\%$ área positiva vs OAVM: $2,83 \pm 0,12\%$ área positiva; $p=0,0009$), siendo la expresión en ambos grupos mayor que en los conejos sanos (**Fig. 18 A**). Por su parte, la expresión de OPG se vio también aumentada significativamente en el grupo OAFM con respecto a OAVM (OAFM: $12,61 \pm 0,67\%$ área positiva vs OAVM: $5,55 \pm 0,32\%$ área positiva; $p=0,0076$), siendo tal expresión mayor en ambos grupos con respecto a los conejos sanos (**Fig. 18 B**). Al realizar el ratio RANKL/OPG se observó un aumento significativo en los cartílagos de las tibias que recibieron la falsa MQ con respecto al grupo OAVM que si la recibieron (**Fig. 18 C**).

Datos en el mismo sentido se obtuvieron al analizar la actividad osteoclástica en el hueso subcondral de tibia mediante la inmunotinción con TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato). Se observó un mayor número de osteoclastos activos por área en el grupo OAFM que en los OAVM (OAFM: 36 ± 9 osteoclastos/área 10X vs OAVM: 28 ± 7 osteoclastos/área 10X; $p=0,0032$) (**Fig. 19**).

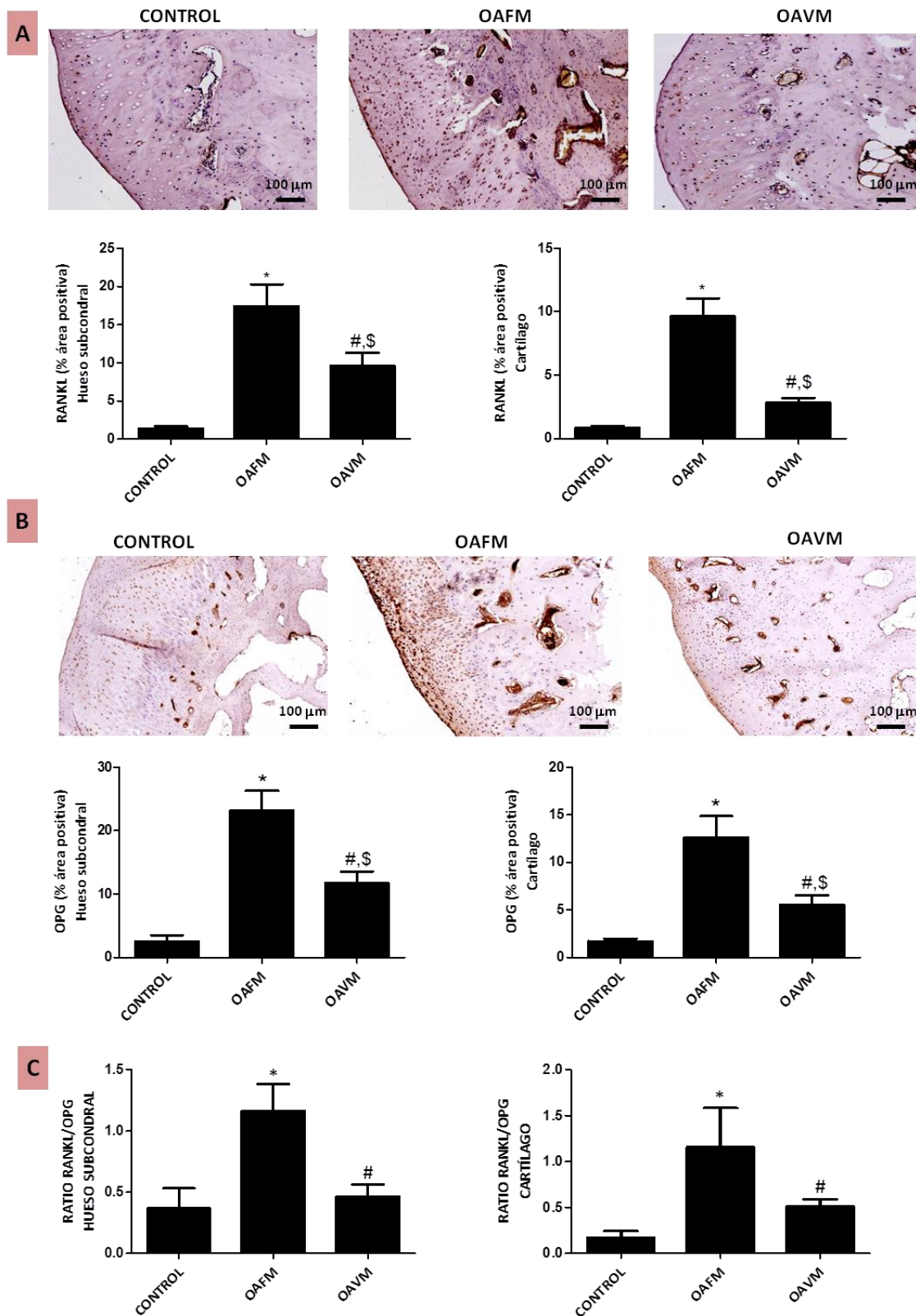


Figura 18. Análisis por inmunohistoquímica del sistema RANKL/OPG en hueso subcondral y cartilago. (A) Representación de los resultados obtenidos para RANKL en ambos tejidos. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m. (B) Datos de la expresión de OPG en cartilago y hueso subcondral. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m. (C) Análisis del ratio de expresión RANKL/OPG. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p < 0,05 vs Control; #p < 0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

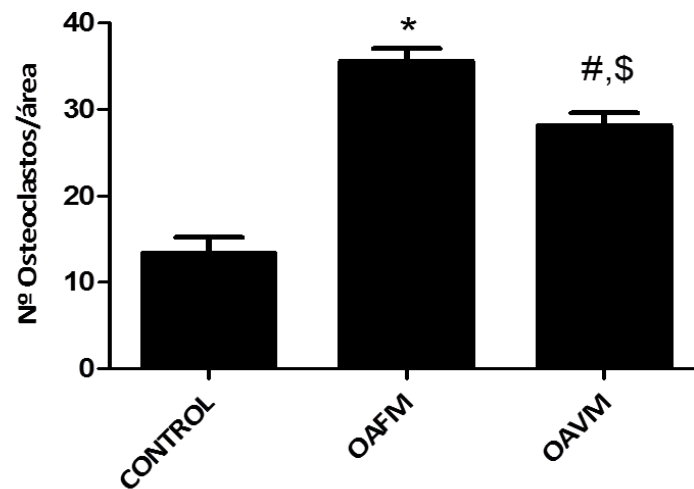
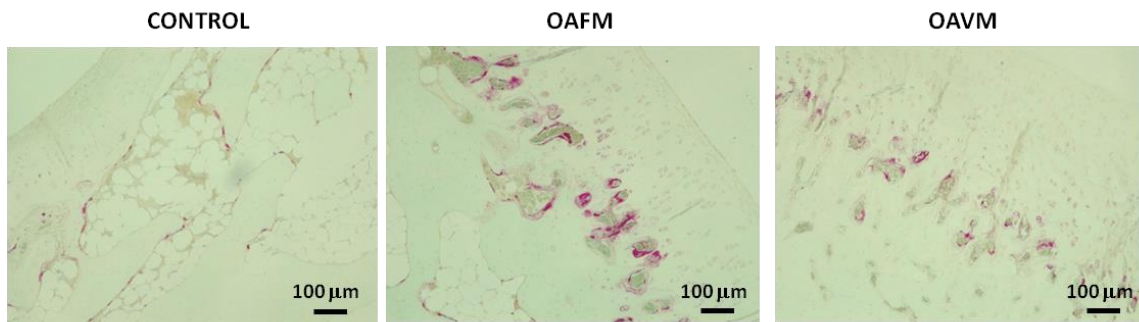


Figura 19. Estudio de diferenciación y actividad osteoclástica en hueso subcondral. La tinción con fosfatasa acida tartrato resistente (TRAP) muestra la distribución de los osteoclastos activos en el hueso subcondral. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p < 0,05 vs Control; #p < 0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m.

De forma complementaria, se estudió la expresión de fosfatasa alcalina (FA), para comprobar el estado de diferenciación y función de los osteoblastos, y su papel en el remodelado óseo existente. Se observó un aumento de la expresión en las tibias de los conejos artrósicos con respecto a los sanos (Control: $8,7 \pm 0,13\%$ área positiva vs OAFM: $31,8 \pm 1,15\%$ área positiva, OAVM: $17,5 \pm 0,43\%$ área positiva; $p=0,002$ y $p=0,036$, respectivamente); y este aumento fue significativamente más elevado en el hueso subcondral de los conejos en cuyas tibias se realizó falsa manipulación, en comparación con las que recibieron verdadera manipulación (OAFM: $31,8 \pm 1,15\%$ área positiva vs OAVM: $17,5 \pm 0,43\%$ área positiva; $p=0,048$) (Fig. 20).

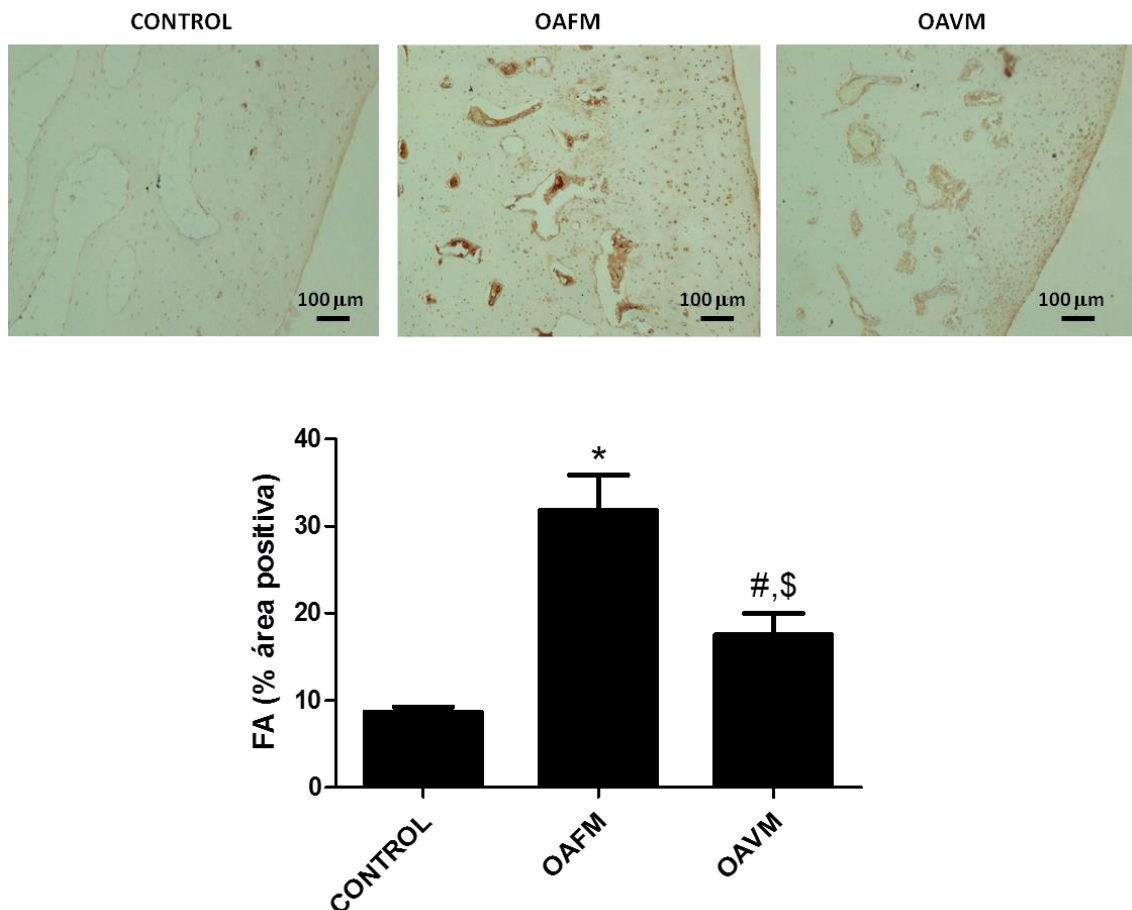


Figura 20. Análisis por inmunohistoquímica de fosfatasa alcalina (FA) en hueso subcondral. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p <0,05 vs Control; #p<0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m.

1.1.4. Mejora del daño en el tejido cartilaginoso en las articulaciones de los conejos artrósicos tras la estimulación mecánica inducida por ActivatorV®.

Se realizó un primer análisis macroscópico de todos los cartílagos de los fémures para valorar el daño producido en cuanto a erosión, fibrilación del tejido y presencia de osteofitos [144] (Fig. 21).

En este estudio se observó que los fémures de los conejos artrósicos que no recibieron MQ, presentaron una mayor erosión y daño en el cartílago, sobre todo en la región medial interna analizada, con respecto a los fémures que sí recibieron verdadera manipulación (OAFM: $2,60 \pm 0,55$ UA vs OAVM: $1,63 \pm 0,74$ UA; p<0,05) (Fig. 21). A nivel del cóndilo lateral externo, no se vieron diferencias significativas entre los dos grupos (Fig. 21). Este hecho va en consonancia con los resultados observados en la microCT del hueso subcondral realizada en

cada placa tibial (externa e interna). Se refleja el mayor daño en la zona medial-interna tanto en el cartílago como en la tomografía ósea de hueso subcondral.

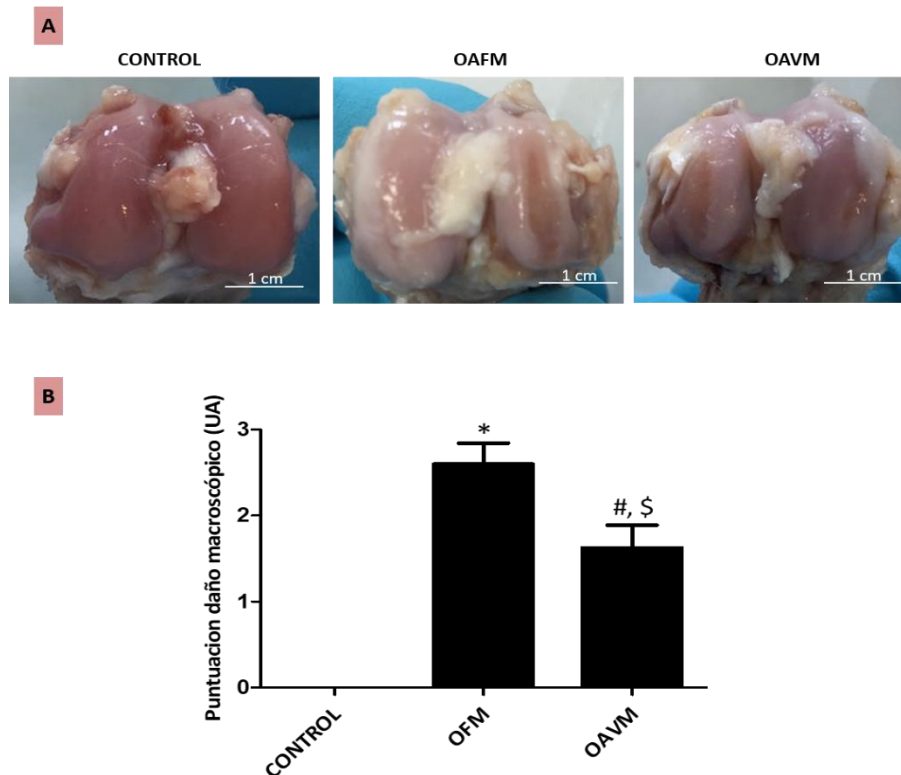


Figura 21. Estudio macroscópico del daño en el cartílago femoral de los conejos en estudio. (A) Imágenes representativas de los cartílagos analizados en cada uno de los tres grupos en estudio. Se valoró tanto el aspecto erosivo y la brillantez como la presencia de osteofitos o irregularidades en el tejido. Escala 1 cm. **(B)** Representación de los datos obtenidos. Los valores son media $\pm \sigma$ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p <0,05 vs Control; #p<0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Escala: 1 cm.

Los cambios a nivel histológico del cartílago de las tibias se evaluaron de acuerdo con la puntuación de *Mankin* descrita por Tiralocche y colaboradores en 2005 [135]. Se valoró tanto la pérdida de tinción de safranina (pérdida de proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago) como la presencia de incisiones y erosiones en la superficie del tejido y la desorganización y pérdida de conformación en columnas de los condrocitos. Además, se evaluó la presencia de clonas (agrupaciones de 4 o más condrocitos en forma de mórula) y la penetración de vasos sanguíneos en el cartílago desde la matriz ósea calcificada adyacente (Fig. 22 A-C).

Una vez realizada la valoración de los cortes histológicos se observó cómo las tibias de los conejos artrósicos tuvieron puntuaciones más altas que los cartílagos de las tibias de conejos control ($6,68 \pm 1,99$ UA vs $0,24 \pm 0,43$ UA, respectivamente; p <0,05) (Fig. 22 D).

Además se comprobó que existía un deterioro severo del cartílago en el grupo OAFM. En este grupo, hubo una pérdida importante de proteoglicanos y una desorganización de los condrocitos. Además se pudieron ver osteonas e inclusión de vasos sanguíneos en el tejido cartilaginoso. Por el contrario, el cartílago de las tibias del grupo OAVM presentó una mejoría significativa en comparación con OAFM, aunque se pudo apreciar también daño a nivel condrocitario y de proteoglicanos (OAFM: $8,21 \pm 3,85$ UA vs OAVM: $5,18 \pm 2,92$ UA; $p=0,036$) (Fig. 22 A-C).

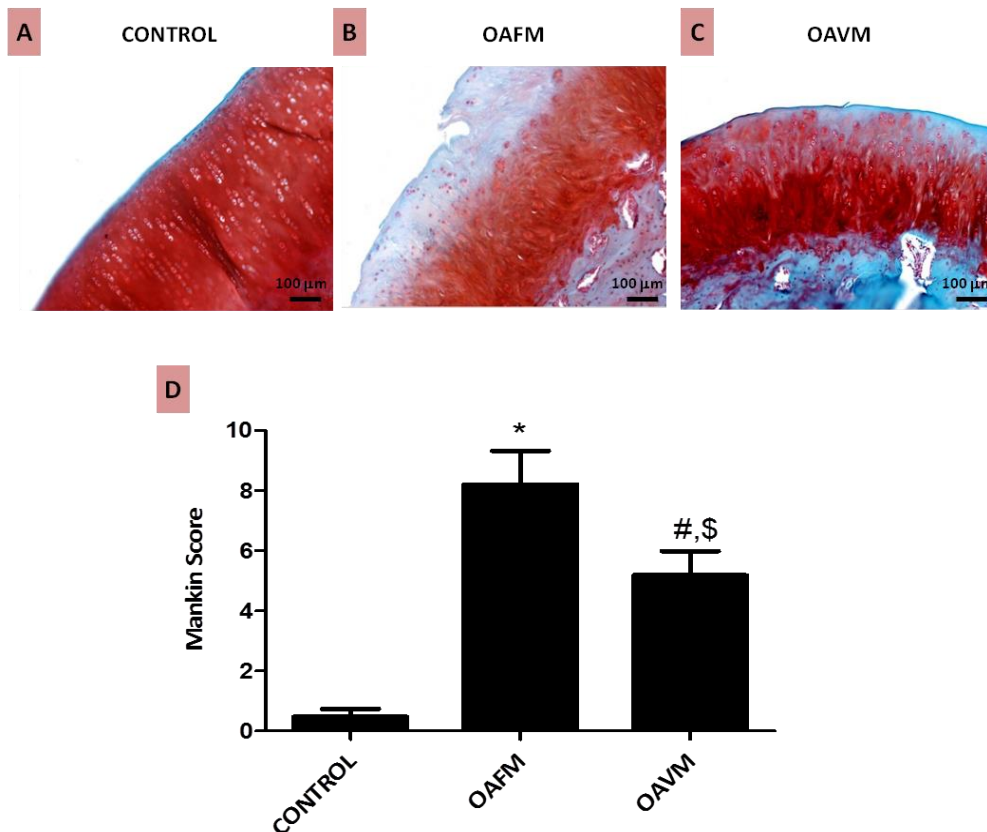


Figura 22. Evaluación del daño producido por la OA en el cartílago de la tibia de los conejos en estudio. (A-C) Secciones representativas del cartílago articular de las tibias de cada uno de los grupos de estudio, teñidas con safranina. El daño se valoró por evaluación de la pérdida de safranina (proteoglicanos), erosión tisular y la organización condrocitaria. **(D)** Las puntuaciones de *Mankin* muestran la degeneración del cartílago sufrida en el grupo de conejos artrósicos, reduciéndose significativamente para el grupo OAVM. *, \$ $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs OAFM. Los valores son media $\pm \sigma$ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m.

1.1.5. La MQ logra mejorar la sinovitis en las articulaciones de los conejos artrósicos.

La membrana sinovial extraída de los conejos se utilizó para hacer estudios tanto histológicos como moleculares. En cuanto a la histología, una vez procesada, cortada y teñida

con hematoxilina/eosina, la membrana sinovial se valoró siguiendo el *Krenn Score* (Fig. 23 A-C). Este *score* estandarizado, reconocido y validado [136] permite valorar el grado de inflamación e infiltrado celular que presenta el tejido, así como el aspecto fibroso y la distribución celular de sus diferentes capas histológicas. Se realizó tanto la valoración conjunta de los tres parámetros principales como por separado (Fig. 23 D-G).

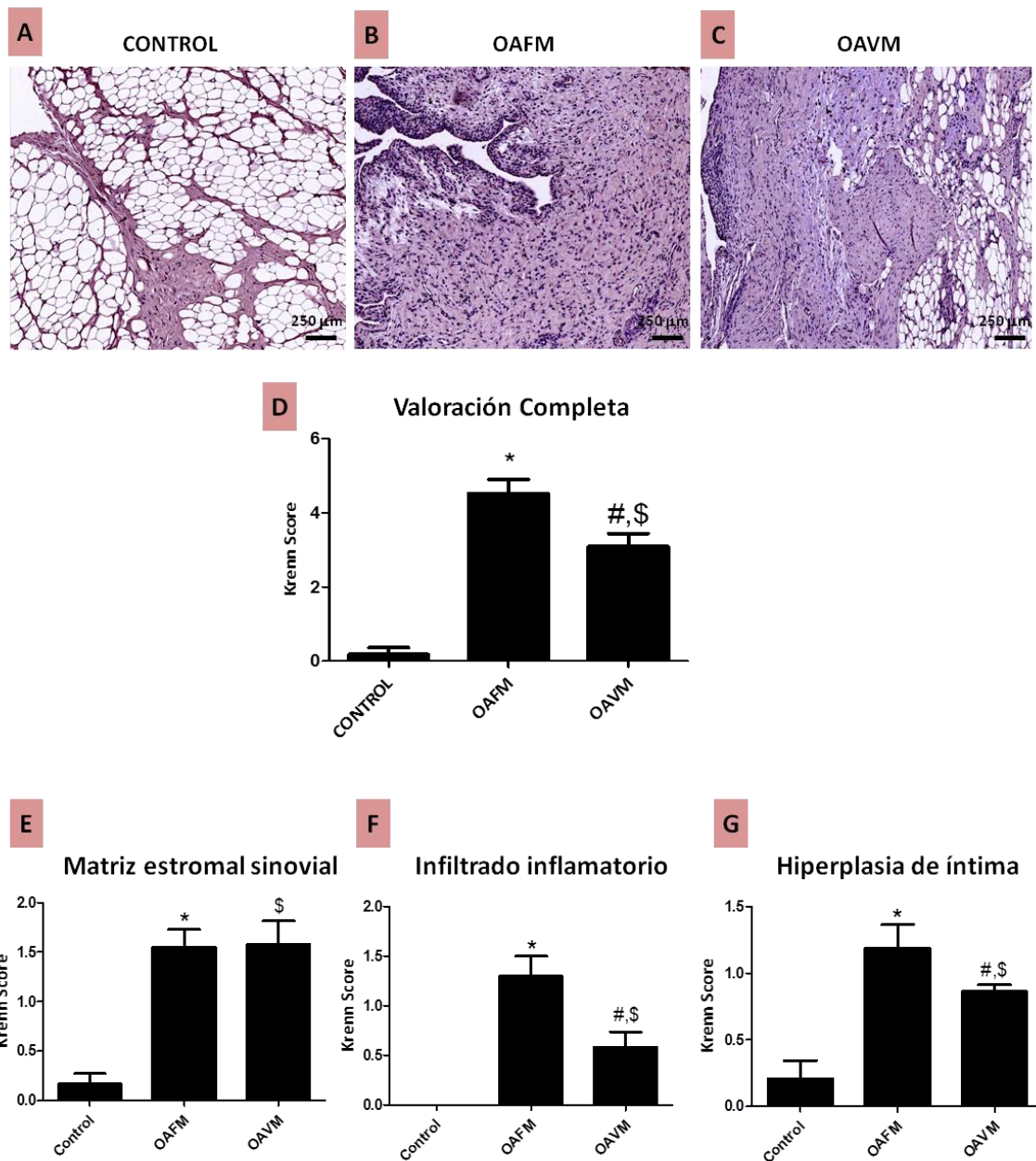


Figura 23. Evaluación del daño en la membrana sinovial. (A-C) Secciones representativas de la membrana sinovial de cada uno de los grupos de estudio, teñidas con hematoxilina y eosina. Aumento: 4X. Escala: 250 μ m. (D) Puntuación global del daño de la membrana sinovial, cuantificada mediante *Krenn Score* (ver material y métodos). Las gráficas E-G representan cada uno de los parámetros del *Krenn Score* analizados por separado. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p<0,05 vs Control; # p<0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

El grupo de conejos artrósicos tuvo una puntuación del *Krenn Score* más alta que los animales sanos, observándose los siguientes aspectos: engrosamiento de la capa íntima celular del revestimiento, un claro incremento en la celularidad del estroma y presencia de células inflamatorias infiltradas (**Fig. 23 D**). Por su parte, el grupo OAFM tuvo una puntuación significativamente más alta que el grupo OAVM ($4,52 \pm 1,02$ UA vs $3,09 \pm 0,93$ UA, respectivamente; $p < 0,05$) (**Fig. 23 D**). Al agrupar los resultados observados para cada parámetro analizado por separado, se observó que tanto la hiperplasia de la íntima como el infiltrado celular estaban significativamente aumentados en el grupo OAFM, siendo especialmente llamativo el aumento de este último parámetro (**Fig. 23 F**).

1.1.6. Estudio de la expresión de marcadores de inflamación en membranas sinoviales de conejos artrósicos sometidos a una falsa o verdadera MQ.

Dado el llamativo cambio en el infiltrado inflamatorio sinovial, observado en los animales que recibieron verdadera MQ, se decidió estudiar tres marcadores clásicos proinflamatorios asociados a la sinovitis en la OA: IL1- β , TNF- α y COX-2 [146].

El estudio de expresión proteica de estos tres marcadores reveló, en los animales artrósicos, un aumento significativo de sus expresiones, en comparación con los niveles encontrados en los animales control (**Fig. 24 A**). Curiosamente estos aumentos fueron significativamente menores en el grupo OAVM con respecto al grupo OAFM para los tres mediadores proinflamatorios (COX-2: $2,57 \pm 0,19$ UA vs $5,11 \pm 1,28$ UA, respectivamente; $p < 0,05$; TNF- α : $1,09 \pm 0,15$ UA vs $1,3 \pm 0,2$ UA, respectivamente; $p < 0,05$ y IL1- β $0,68 \pm 0,13$ UA vs $1,38 \pm 0,21$ UA respectivamente; $p < 0,01$) (**Fig. 24 B-C**).

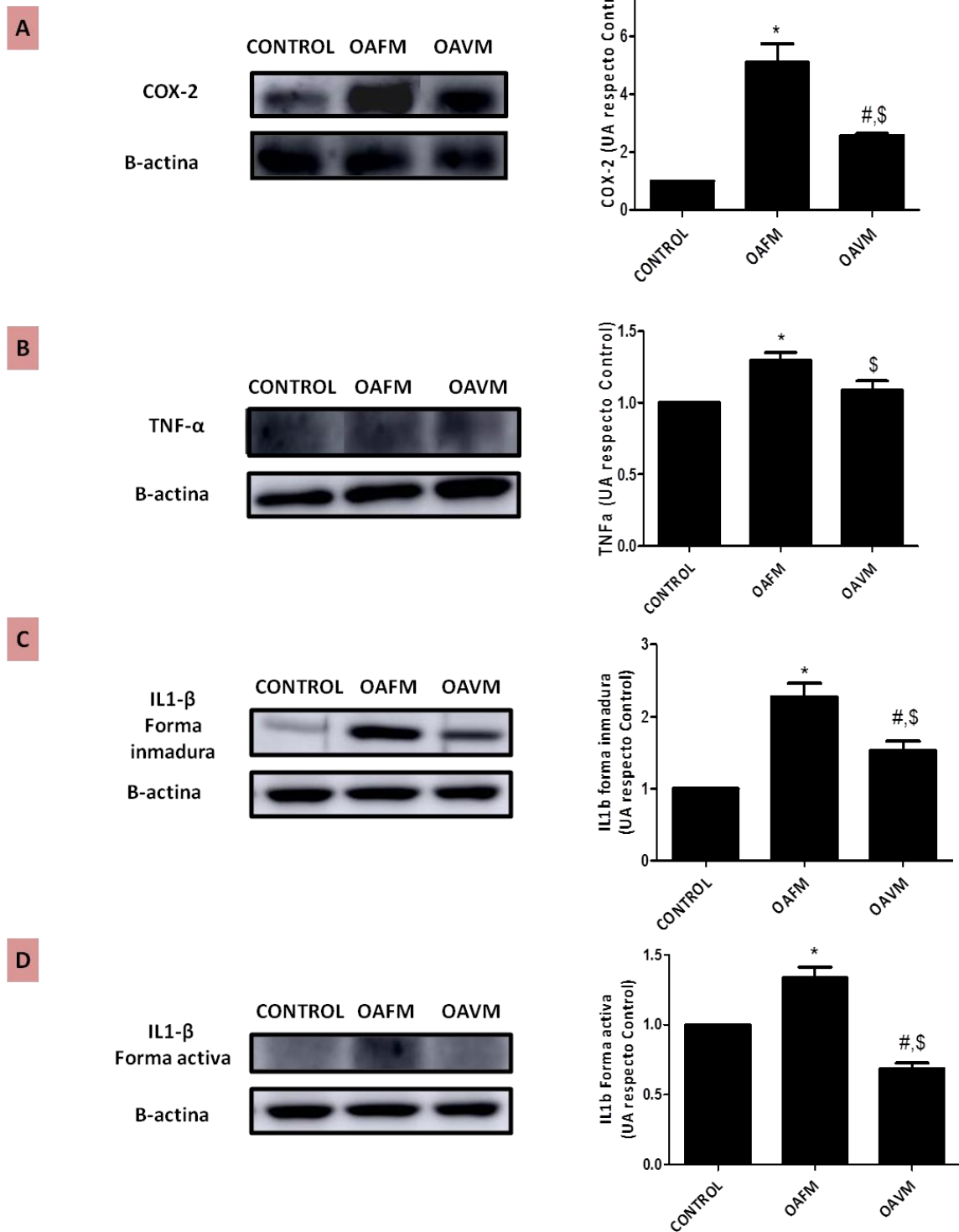


Figura 24. Expresión proteica de COX-2 (A), TNF-α (B) e IL1-β inactiva (C) y activa (D) en las membranas sinoviales de cada uno de los grupos experimentales estudiados. El control de carga de las proteínas se llevó a cabo normalizando con β-actina. Los valores son media ± σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p<0,05 vs Control; # p <0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

1.1.7. Análisis del infiltrado macrófágico en las sinoviales de conejos artrósicos con falsa o verdadera manipulación utilizando el ActivatorV®.

Seguidamente, se estudió la presencia de macrófagos infiltrados en la membrana sinovial de los conejos. Para ello se realizó inmunohistoquímica del marcador de macrófagos alveolares de conejo RAM-11 (*Rabbit Alveolar Macrophages 11*) (Fig. 25).

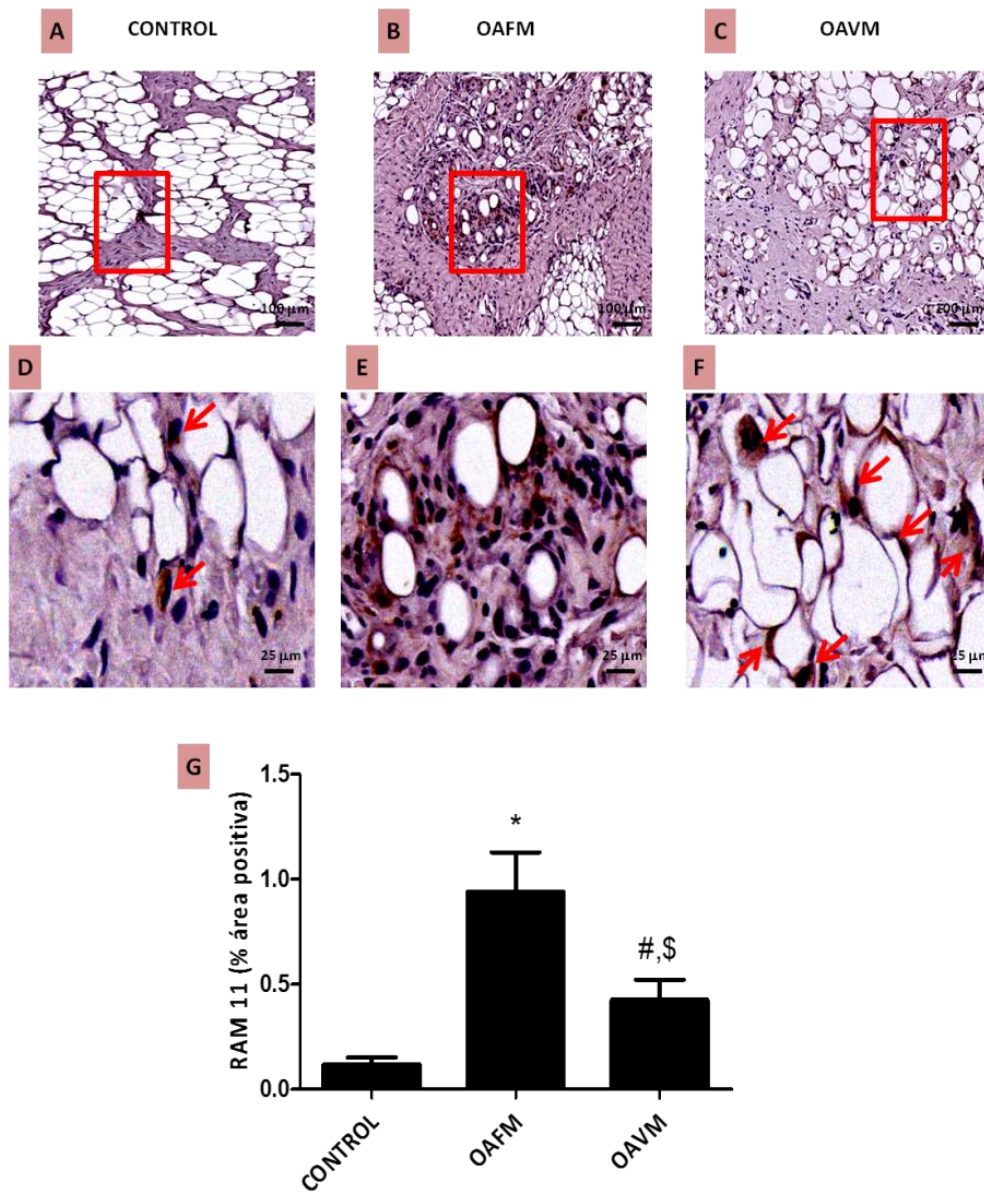


Figura 25. Evaluación del infiltrado celular macrófágico en membrana sinovial. (A-F) Inmunohistoquímica de secciones representativas de membrana sinovial de cada uno de los grupos en estudio utilizando el anticuerpo monoclonal anti-macrófago RAM11. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). (G) *, \$ p<0,05 vs Control; # p<0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney. (A-C) Aumento: 10X. Escala: 100 μ m. (D-F) Aumento: 40X. Escala: 25 μ m.

Mientras que apenas se observó expresión de RAM-11 en las membranas sinoviales de los animales sanos; el grupo de sinoviales del grupo OAFM presentó una expresión aumentada tanto en el estroma sinovial como en la capa íntima (**Fig. 25 B**). Igualmente, se observó expresión de RAM-11 en las mismas zonas tisulares en el grupo artrósico con verdadera manipulación que las descritas para el grupo con falsa manipulación (**Fig. 25 C**), sin embargo la cuantificación reveló una disminución significativa en su intensidad en comparación con el grupo OAFM (OAFM: $0,94 \pm 0,50\%$ área positiva vs OAVM: $0,43 \pm 0,27\%$ área positiva; $p=0,02$) (**Fig. 25 D**).

1.1.8. El estímulo mecánico inducido por la MQ modula la angiogénesis en la membrana sinovial durante la artrosis.

La importancia potencial de la neo-vascularización sinovial en la OA permanece en gran parte desconocida, aunque varios investigadores han mostrado la relación entre el daño tisular de la membrana sinovial y un aumento de la angiogénesis en pacientes tanto con OA, como con artritis reumatoide [147]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un potente estimulador de la angiogénesis y también puede contribuir a la inflamación a través de la extravasación de plasma; lo que aumenta la posibilidad de que el VEGF derivado del tejido sinovial pudiera contribuir a la angiogénesis y la inflamación en la OA [148]. Por lo tanto, se decidió estudiar si su expresión pudiera estar modulada por la MQ.

Se analizó mediante western blot la expresión en membrana sinovial de VEGF-164 (Vascular Endotelial Growth Factor-164, factor de crecimiento endotelio-vascular tipo 164) y mediante inmunohistoquímica la expresión de CD31 (molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas, también conocida como PECAM-1). Se observó que en el grupo artrósico había un aumento en la expresión de VEGF-164 con respecto al grupo control. La manipulación mecánica verdadera con ActivatorV[®] redujo significativamente la expresión de este marcador (OAFM: $1,99 \pm 0,62$ UA vs OAVM; $1,35 \pm 0,25$ UA; $p < 0,05$) (**Fig. 26 A**). Además, el estudio de la expresión de la proteína endotelial CD31 en los tres grupos de estudio, reveló que las membranas sinoviales de las extremidades con verdadera manipulación presentaron una menor vascularización que las membranas que no recibieron verdadero estímulo mecánico con ActivatorV[®] (OAFM: $0,84 \pm 0,49\%$ área positiva vs OAVM: $0,29 \pm 0,11\%$ área positiva; $p=0,005$) (**Fig. 26 B-E**).

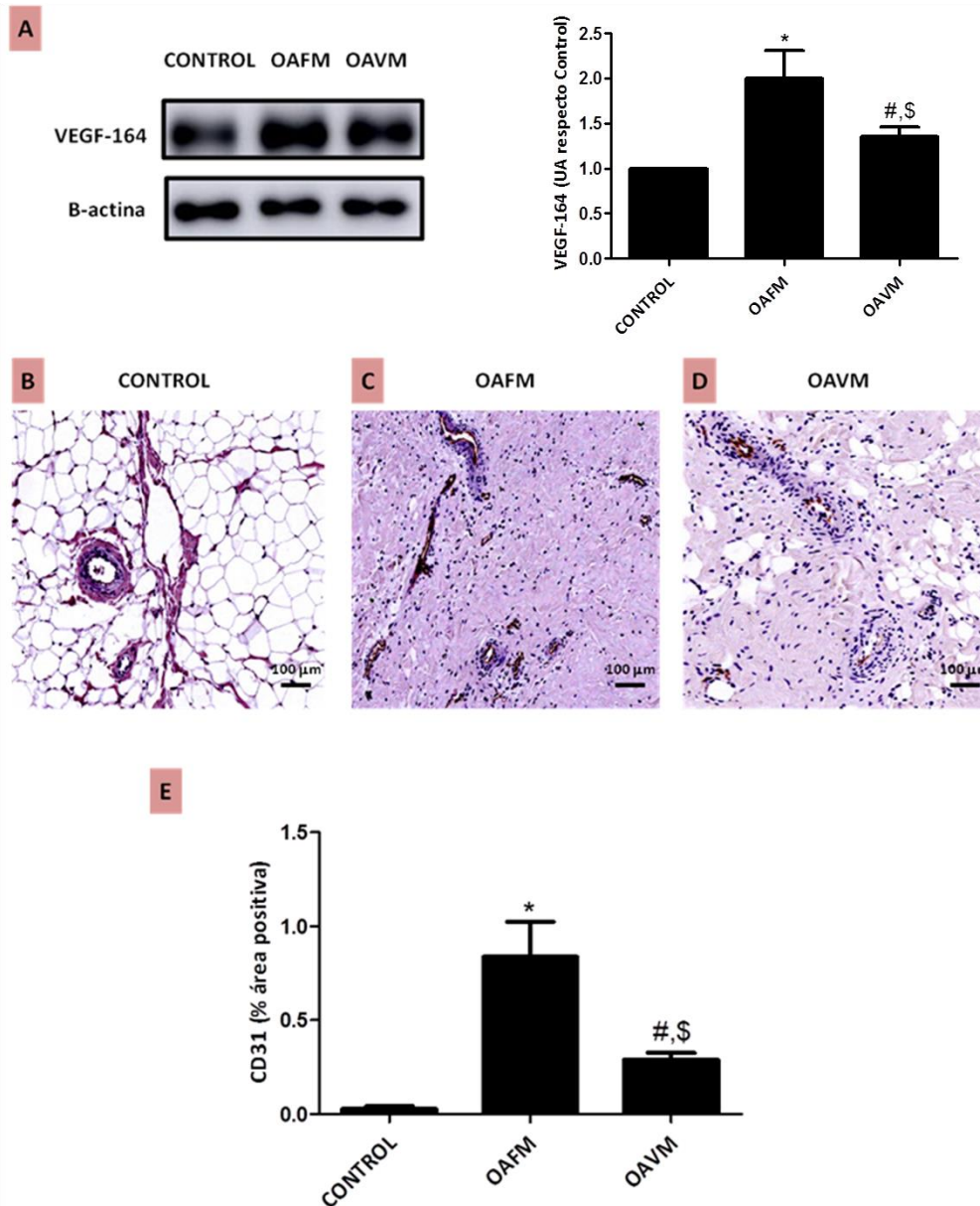


Figura 26. Valoración de la angiogénesis en membrana sinovial. (A) Expresión proteica de VEGF-164. **(B-D)** Inmunohistoquímica de secciones representativas de sinovial utilizando el anticuerpo monoclonal anti-conejo CD31. Aumento: 10X. Escala: 100 μ m. **(E)** Expresión de CD31 en la membrana sinovial de los conejos en estudio. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ p<0,05 vs Control; # p<0,05 vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

1.1.9. El estímulo mecánico inducido por la MQ reduce la fibrotización de la matriz estromal en membrana sinovial.

Dado que la fibrotización y la desestructuración de la matriz extracelular son dos de los principales daños que se producen durante la OA en la sinovial, se analizó la expresión de MMP-3 y colágeno VI (**Fig. 27 A-B**). Se observó que en el grupo artrósico había un aumento en

la expresión de MMP-3, siendo más evidente el aumento en OAFM (OAFM $1,74 \pm 0,45$ UA vs OAVM $1,22 \pm 0,29$ UA; $p < 0,05$) (Fig. 27 A). Con la MQ verdadera, la expresión de MMP-3 se redujo significativamente. Por su parte, la expresión en las membranas con falsa manipulación mostraron un aumento importante en la expresión de colágeno VI con respecto al grupo OAVM (OAFM $2,22 \pm 0,57$ UA vs OAVM $1,43 \pm 0,33$ UA; $p < 0,05$) (Fig. 27 B). La verdadera MQ consiguió reducir la expresión de colágeno VI (aumentado en OAFM), sin llegar a los niveles de los controles (OAVM $1,43 \pm 0,33$ UA vs Control $1 \pm 0,49$ e-005 UA; $p=0,15$) (Fig. 27 B).

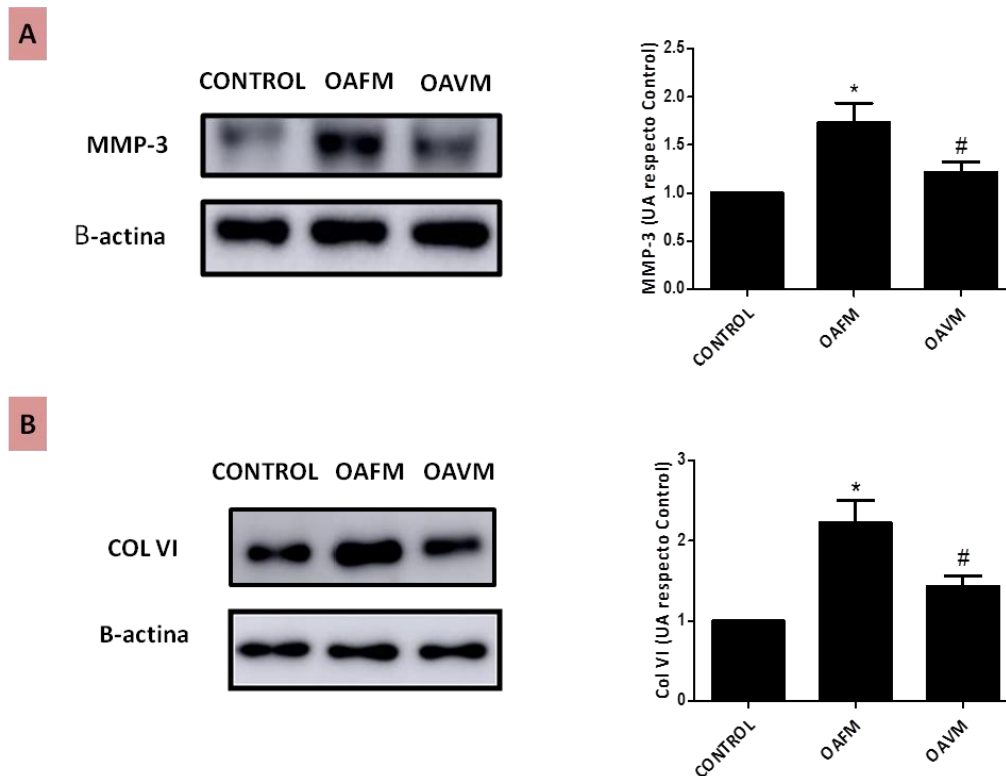


Figura 27. Expresión proteica de MMP-3 (A) y COL VI (B) en las membranas sinoviales de cada uno de los grupos experimentales estudiados. El control de carga de las proteínas se llevó a cabo normalizando con β -actina. Los valores son media $\pm \sigma$ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

1.1.10. Cambios en la expresión de neurotrofinas tras la MQ en las articulaciones de conejos artrósicos.

Recientes estudios científicos han demostrado que la expansión axonal de fibras sensitivas en tejidos aneurales o poco inervados podría estar relacionado con la generación de dolor en la OA [42]. En este sentido, se ha propuesto que la angiogénesis patológica descrita en la OA promueve esta expansión axonal en los vasos recién formados. Esta expansión axonal

se produce tanto en la unión osteocondral, como en la membrana sinovial y el menisco, facilitando así la transmisión del dolor derivado de la OA [149].

Dado que la quiropráctica ejerce un efecto tanto a nivel ortopédico como a nivel nervioso [60], modulando con ello también el dolor; como parte final de este estudio se exploró su potencial implicación en la regulación neurosensible (nociceptora) de la membrana sinovial [150]. Para ello, se estudió la posible modulación en la expresión de dos neurotrofinas, Sema 3A y Netrina-1.

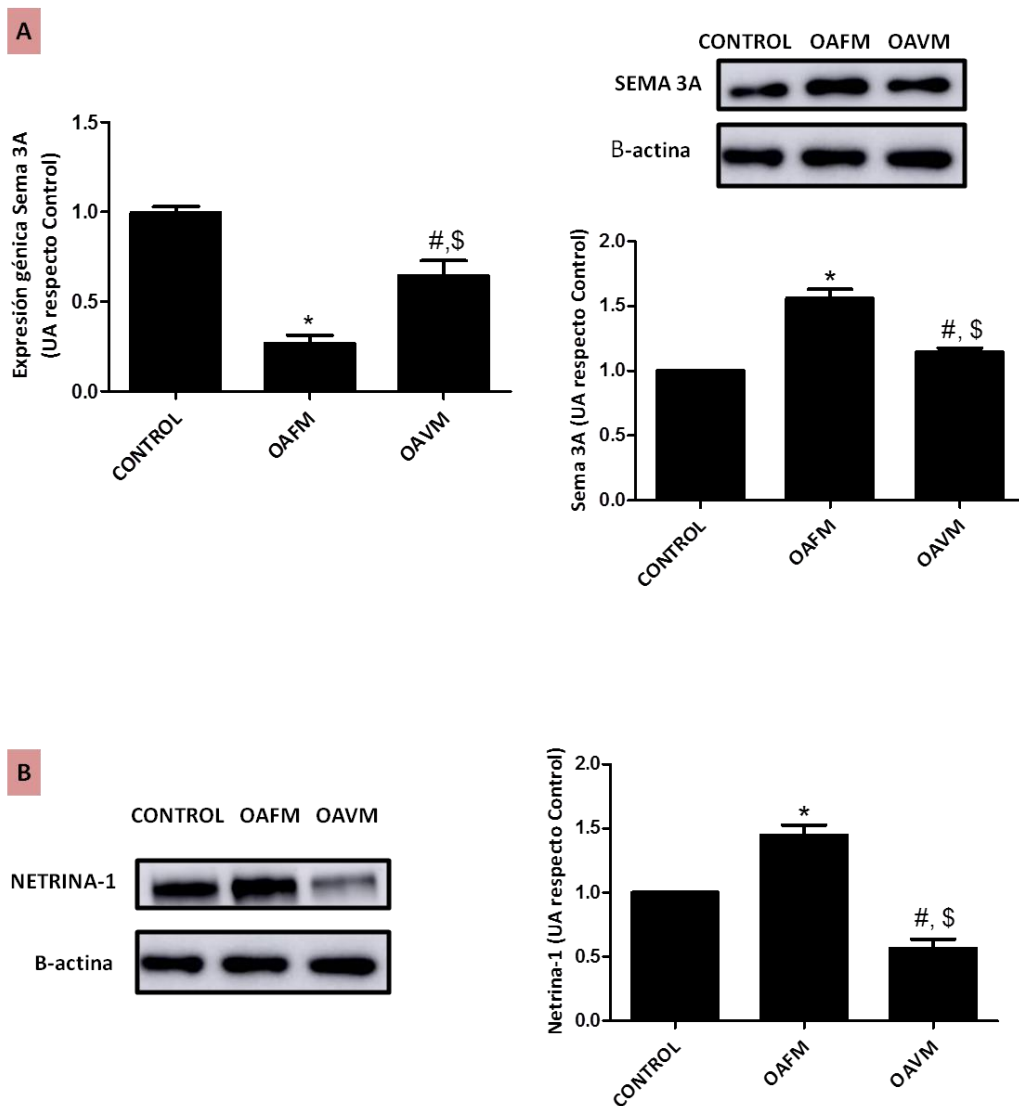


Figura 28. Estudio de expresión de las neurotrofinas Sema 3A y Netrina-1 en membrana sinovial. (A) Expresión génica y proteica de Sema 3A. **(B)** Expresión proteica de Netrina-1. El control de carga de las proteínas se llevó a cabo normalizando con β -actina **(B-C)**. Los valores son media \pm σ (N= 6 control, N= 10 OAFM y N= 10 OAVM). *, \$ $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs OAFM. Las significaciones fueron obtenidas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Se observó que la expresión de Sema 3A medida por PCR, disminuyó en las membranas sinoviales de las articulaciones artrósicas con respecto a las sanas, siendo más evidente este descenso en las que no recibieron la manipulación con ActivatorV® (OAFM: $0,27 \pm 0,09$ UA vs OAVM $0,64 \pm 0,17$ UA, $p=0,029$) (**Fig. 28 A**). Curiosamente, la expresión proteica de Sema 3A en las membranas sinoviales de los conejos artrósicos se vio aumentada significativamente, siendo mayor este incremento en el tejido de la articulación que no recibió la MQ con respecto a la que sí que la recibió (OAFM: $0,57 \pm 0,57$ UA vs OAVM $0,78 \pm 0,83$ UA, $p<0,01$) (**Fig. 28 B**).

Por otro lado, en cuanto al estudio de la expresión proteica de Netrina-1, se observó que hubo un aumento en las sinoviales de las articulaciones que recibieron falsa MQ de la articulación con respecto a las manipuladas mecánicamente con ActivatorV® (OAFM: $1,45 \pm 0,20$ UA vs OAVM $0,56 \pm 0,19$ UA, $p=0,012$) (**Fig. 28 C**).

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.

2.1. RESULTADOS IN VITRO.

2.1.1. Tenofovir modula la diferenciación de osteoclastos a través de un mecanismo dependiente del transporte de ATP y adenosina.

Para determinar si el tratamiento con tenofovir afecta directamente a la diferenciación y función de los osteoclastos, se aislaron células BMC primarias murinas de médula ósea y se diferenciaron a osteoclastos en presencia de tenofovir. Se observó que el tratamiento con tenofovir produjo un aumento en la diferenciación de los osteoclastos que fue dependiente de la dosis (EC₅₀= 44,5 nM; **Fig. 29 A**).

Estudios previos realizados mostraron que el tratamiento con tenofovir producía la disminución de la concentración extracelular de adenosina, debido a la inhibición en el transporte de ATP a través de panexina-1 [108]. Para contrarrestar este efecto, se decidió poner en práctica un experimento que nos permitiese aumentar los niveles de adenosina extracelulares, bloqueando su transporte al interior celular. Con este objetivo, procedimos a tratar las células con dipiridamol y comprobamos que se consiguió revertir el efecto de tenofovir en la diferenciación de osteoclastos (IC₅₀= 0,3 µM). Para confirmar la activación en la diferenciación de osteoclastos, los precursores celulares tratados con tenofovir y dipiridamol fueron recolectados a los 0, 3 y 7 días de diferenciación, se extrajo ARN y valoramos la expresión de marcadores importantes en el desarrollo y función de los osteoclastos. Tenofovir aumentó modestamente la expresión de catepsina K (una cisteín-proteasa que cataliza la hidrólisis de proteínas) hasta un cambio de 73 veces al día 7 de cultivo en comparación con las células que sólo recibieron estímulo con RANKL (cambio de 66 veces; p=ns; **Fig. 29 B**). El tratamiento con dipiridamol produjo una disminución en la expresión de la catepsina K en los puntos finales del tratamiento (27 veces en el día 3 y 3,6 veces el día 7; p <0,001); resultados similares se vieron con el tratamiento combinado de tenofovir y dipiridamol (**Fig. 29 B**). Por otro lado, tenofovir aumentó la expresión del factor nuclear de células T activadas tipo 1 (NFATc1) requerido para la diferenciación de los osteoclastos, siendo este aumento 18 veces mayor al día 7 de tratamiento, comparado con las células que no recibieron tratamiento

[tratadas solamente con RANKL (9 veces, $p < 0,05$)]. Como se describe para catepsina K, dipiridamol disminuyó la expresión por sí solo, y en presencia de tenofovir (4 veces, $p < 0,001$; **Fig. 29 B**). Finalmente, se estudió la expresión de osteopontina (componente de la matriz ósea que juega un papel importante en la mineralización y unión de la fase mineral a la matriz), viéndose aumentada en presencia de tenofovir después de 7 días de incubación (16 veces versus 7 veces para RANKL; $p < 0,05$). Dipiridamol previno el aumento en la expresión de osteopontina y revirtió parcialmente el aumento inducido por tenofovir (cambio de seis veces; **Fig. 29 B**).

Para corroborar el efecto inhibitorio de tenofovir sobre los transportadores de ATP, realizamos experimentos de liberación y cuantificación de ATP en osteoclastos en cultivo (**Fig. 30 A**). Para ello, utilizamos probenecid, un inhibidor selectivo de panexina-1, como control positivo de inhibición del transporte de ATP [151, 152]. Se estudió el efecto de tenofovir en combinación con probenecid, viéndose una disminución más potente de la liberación de ATP que con el tratamiento de probenecid en solitario ($73,8\% \pm 5$ probenecid; $23\% \pm 19$ probenecid + tenofovir vs control (100%); $p < 0,03$). Así mismo, se observó que la inhibición del transporte con tenofovir seguía una dosis-respuesta clara, viéndose inhibida la liberación de ATP en un 56% a concentración de $1 \mu\text{M}$ para tenofovir ($p < 0,03$) y en torno al 90% para $10 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) (**Fig. 30 B**).

Para estudiar el mecanismo por el cual tenofovir estimula la diferenciación de osteoclastos, silenciamos de forma permanente la línea celular macrofágica RAW264.7 para los transportadores panexina-1, conexina-43 y el receptor A_{2A} de adenosina. Como se muestra en la **Figura 30 B**, en los experimentos de diferenciación de osteoclastos y su posterior tinción con TRAP, tenofovir no consiguió aumentar el número de osteoclastos cuando panexina-1 y conexina-43 estaban silenciados ($n=3$ experimentos independientes).

Paralelamente, se realizó un estudio de resorción ósea, cultivando los osteoclastos en discos de dentina, los cuales teñimos tras 7 días de diferenciación celular con azul de toluidina. Analizando los resultados se encontró que en las células shRNA *scramble* utilizadas, tenofovir aumentó la diferenciación de osteoclastos y la resorción de los discos de dentina (en la **Fig. 30 C** se aprecian las fosas de erosión en azul oscuro), disminuyendo tal efecto con la administración de dipiridamol. Por otro lado, cuando se trataron las células silenciadas para panexina-1 y conexina-43 con tenofovir, hubo una menor resorción de los discos de dentina, viéndose menos fosas de resorción. Por el contrario, cuando se silenció el receptor A_{2A} hubo una mayor resorción y se apreciaron más fosas de resorción en los discos (**Fig. 30 C**). A

diferencia de lo descrito anteriormente, dipiridamol consiguió revertir el efecto de tenofovir sobre la formación de fosas de resorción en las células RAW264.7 control y shRNA cuando panexina-1 y conexina-43 estaban silenciadas, pero no en las silenciadas para el receptor de adenosina A_{2A} (Fig. 30 C).

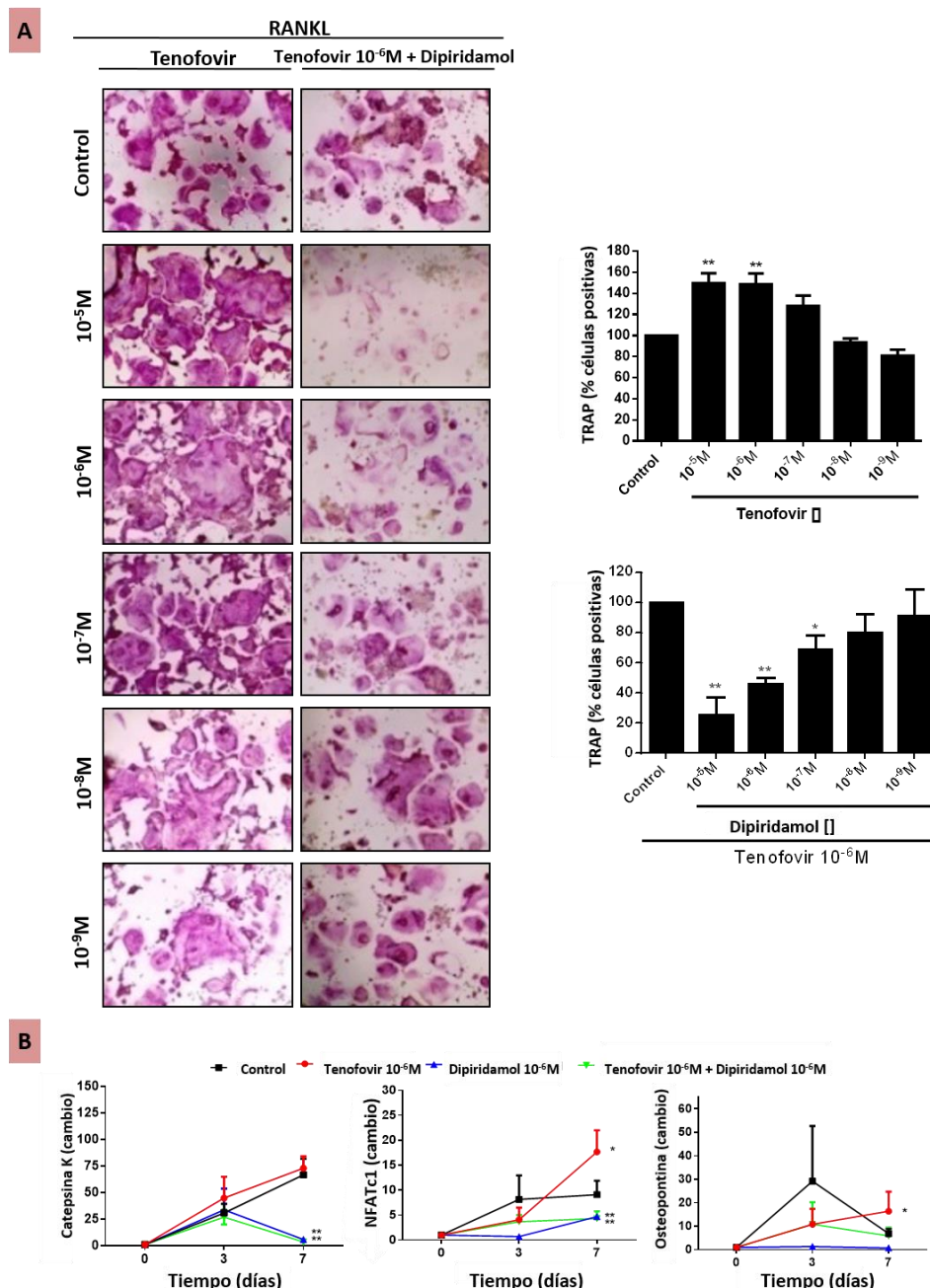


Figura 29. Tenofovir potencia la diferenciación de los osteoclastos *in vitro* y su efecto es revertido por el dipiridamol. (A) Los osteoclastos derivados de células de médula ósea murinas se fijaron y se tiñeron para TRAP después de cultivarlos en presencia de tenofovir (10 μ M a 1 nM) solo o en combinación con dipiridamol (10 μ M a 1 nM). Las células TRAP positivas que contienen tres o más núcleos se contaron como osteoclastos. **(B)** Cambios en el ARNm de catepsina K, NFATc1 y osteopontina durante la diferenciación de osteoclastos en presencia de tenofovir 1 μ M solo o en combinación con dipiridamol 1 μ M. Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=5 experimentos independientes) *p <0,05, **p <0,005 vs Control (ANOVA).

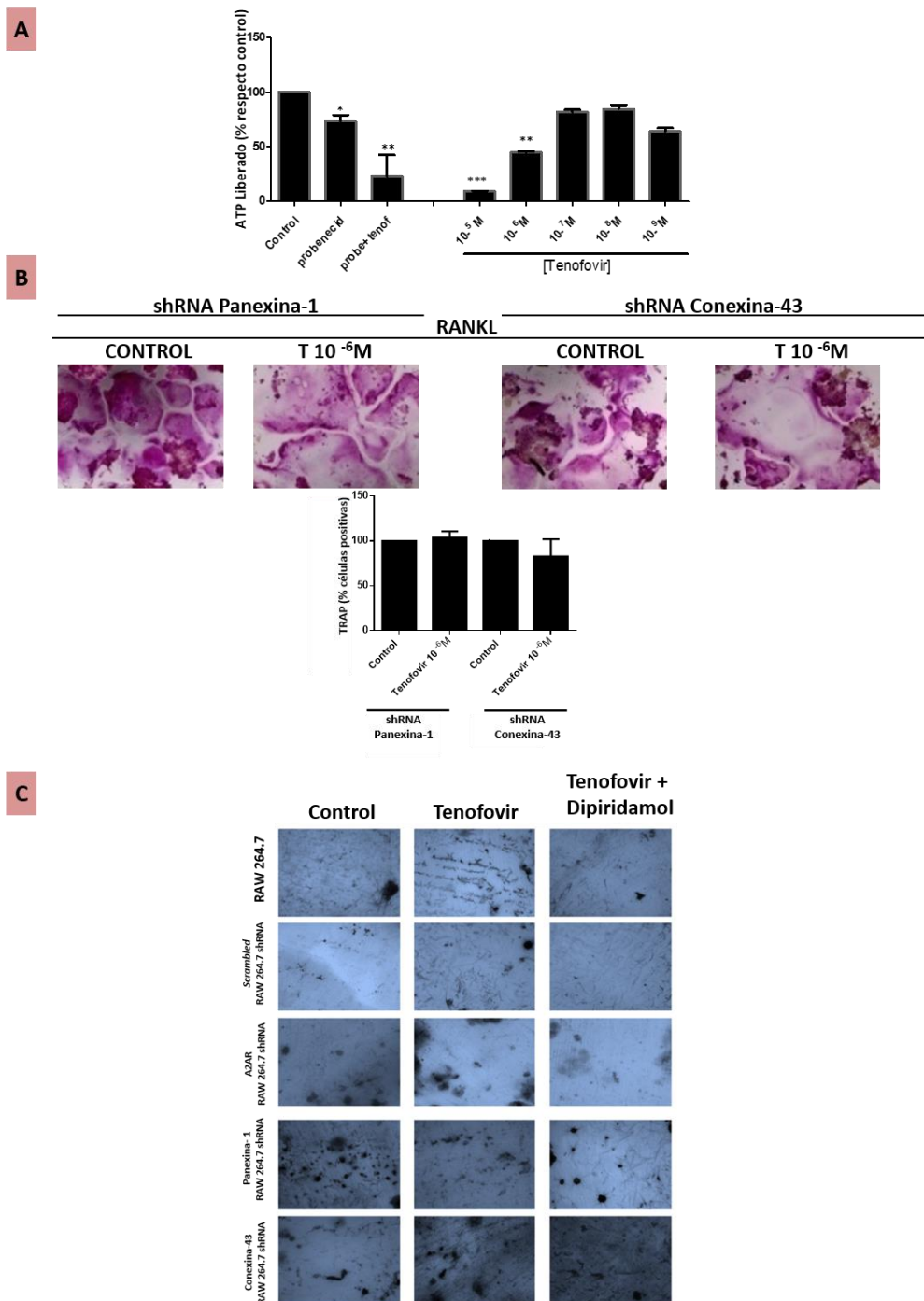


Figura 30. Tenofovir potencia la diferenciación de células RAW 264.7 *in vitro* en un mecanismo relacionado con el transporte de ATP por panexina-1 y conexina-43, siendo revertido el efecto por dipiridamol. (A) Estudio de liberación de ATP en presencia de probenecid (inhibidor selectivo de los transportadores) y tenofovir en dosis respuesta (10 μ M a 1nM). Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=2 experimentos independientes). *probe + tenof*: probenecid + tenofovir. **(B)** Los osteoclastos derivados de RAW264.7 silenciados para panexina-1 y conexina-43 se fijaron y se tiñeron para TRAP después de ser cultivadas en presencia de tenofovir 1 μ M. Las células TRAP positivas que contenían tres o más núcleos se contaron como osteoclastos. Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=3 experimentos independientes). **(C)** Las células RAW264.7 silenciadas para panexina-1, conexina-43 y A_{2A} tratadas con 50 ng/ml de RANKL se cultivaron en discos de dentina para estudiar la diferenciación y acción resortiva de las mismas. Se realizó tinción con azul de toluidina para visualizar los surcos de erosión (azul oscuro). Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=3 experimentos independientes). *p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,001 vs Control (ANOVA).

2.1.2. Tenofovir estimula la diferenciación de osteoclastos, a través de la activación de MAPKs y la translocación al núcleo de NFkB y el pre-tratamiento con dipiridamol revierte el efecto.

Para estudiar las posibles vías de señalización intracelular por las que tiene lugar el efecto de tenofovir en la potenciación de la diferenciación de los osteoclastos, se realizaron experimentos en precursores de osteoclastos pre-tratando las células con dipiridamol 30 minutos (para conseguir un aumento de la concentración extracelular de adenosina) antes de iniciar el tratamiento simultáneo con tenofovir.

Tras el tratamiento con RANKL (control), observamos, como cabría esperar, un aumento rápido (5 minutos) en la fosforilación de ERK1/2 y en las células tratadas con tenofovir observamos que hay un aumento pronunciado de este efecto ($30 \pm 9\%$ más que el basal vs $19 \pm 7\%$ de aumento con respecto al basal para RANKL, $p < 0,05$; **Fig. 31**). Al tratar con dipiridamol, se observa la reversión en el aumento de la fosforilación de ERK1/2 producido por tenofovir ($p < 0,001$ vs tenofovir; **Fig. 31**). Se observaron resultados similares cuando estudiamos la fosforilación de p38 en las células tratadas con tenofovir, dipiridamol y la combinación de ambos (en este caso a los 10 minutos) (**Fig. 31**). En contraste, ni tenofovir ni dipiridamol, ni la combinación de ambos tratamientos produjo cambios significativos en la fosforilación de JNK inducida por RANKL (**Fig. 31**).

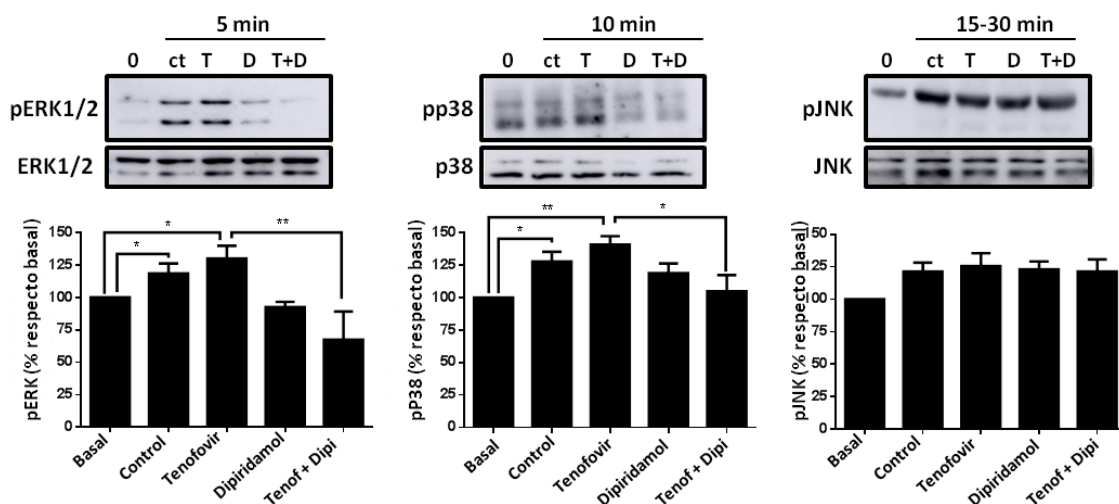


Figura 31. El pre-tratamiento con dipiridamol revierte la fosforilación de ERK1/2 y p38 inducida por tenofovir durante la diferenciación de los osteoclastos. Se estudió la vía de señalización MAPK durante la diferenciación de osteoclastos (estimulación de 5 a 30 minutos) en presencia de tenofovir $1\mu\text{M}$ solo o en combinación con dipiridamol $1\mu\text{M}$. Para normalizar la carga de proteínas, las membranas se incubaron con ERK2, p38 o JNK, respectivamente. Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=5 experimentos independientes). * $p < 0,5$, ** $p < 0,005$ vs Control (ANOVA). Ct: control, T: tenofovir, D: dipiridamol, T+D/Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

Por otro lado, cuando estudiamos la translocación al núcleo de NFκB, observamos que tenofovir reduce la expresión de p50/p150 en el citoplasma (reducción de un 60% ± 10% sobre el basal, $p < 0,0001$) y cuando tratamos con dipiridamol, se revierte el efecto (aumento de 29 veces ± 10% sobre el basal, $p < 0,0001$, vs tenofovir). De igual modo, la estimulación con RANKL aumentó los niveles de p50/105 nucleares y cuando añadimos tenofovir al medio ($241 \pm 34\%$ para RANKL vs $181 \pm 25\%$ para tenofovir con respecto basal, $p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente). Por su parte, dipiridamol inhibe la translocación al núcleo de p50/105 ($170 \pm 28\%$ de disminución, $p < 0,005$, vs tenofovir; **Fig. 32**). Todos estos cambios son consistentes con la disminución de IκBα ($68 \pm 6\%$ de disminución para células tratadas con RANKL vs $63 \pm 8\%$ en las células tratadas además con tenofovir, $p < 0,001$) y un aumento de fosfo-IκBα ($180 \pm 22\%$ mayor en presencia de RANKL y $210 \pm 14\%$ de aumento después del tratamiento con tenofovir, $p < 0,05$, vs basal). Nuevamente, dipiridamol revirtió el efecto de tenofovir ($p < 0,05$; **Fig. 32**).

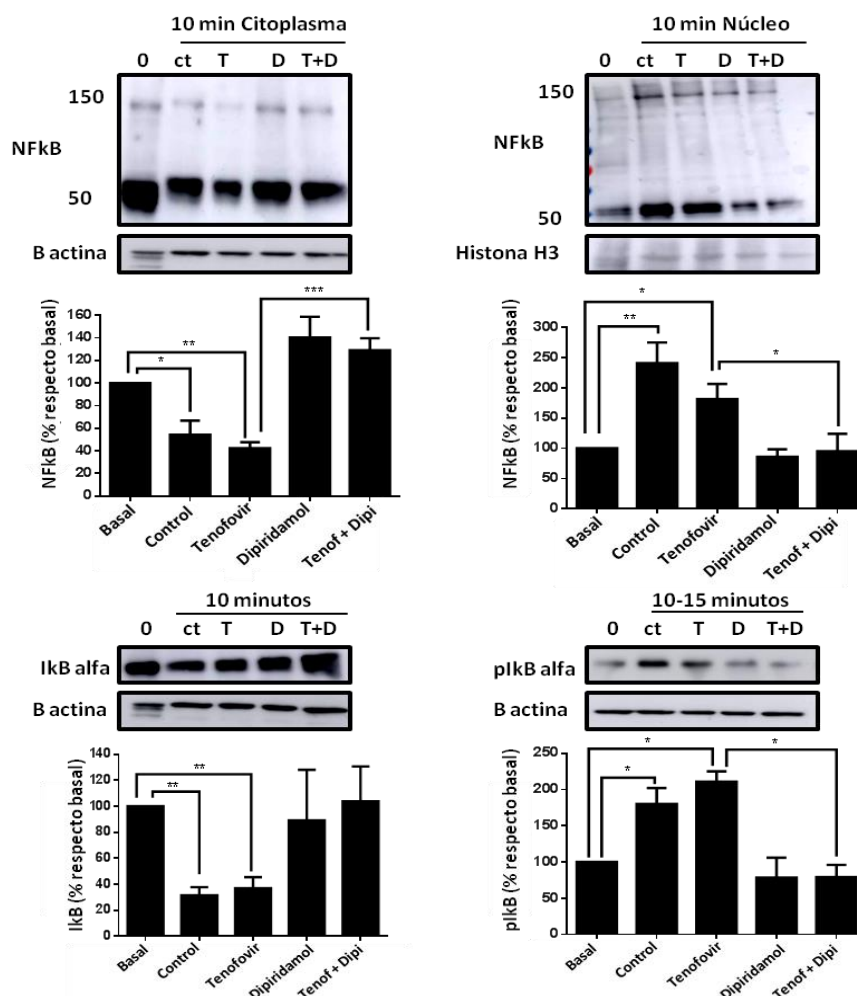


Figura 32. El pre-tratamiento con dipiridamol revierte la translocación nuclear de NFκB inducida por tenofovir durante la diferenciación de los osteoclastos. Se estudió la translocación nuclear de NFκB p50/p105, IκBα y p-IκBα en presencia de tenofovir 1 μM solo o en combinación con dipiridamol 1 μM. Los resultados mostrados representan las medias ± EEM (N=5 experimentos independientes). * $p < 0,5$ vs Control, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ (ANOVA). Ct: control, T: tenofovir, D: dipiridamol, T+D/Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

2.1.3. Tenofovir promueve la fosforilación de ERK1/2 y p38, así como la translocación al núcleo de NFkB durante la diferenciación de osteoclastos pre-tratados con tenofovir; no viéndose revertido tal efecto con dipiridamol.

De forma análoga a lo que describimos en el apartado anterior, decidimos realizar los experimentos de diferenciación de osteoclastos pre-tratando las células durante 30 minutos con tenofovir. Con ello se pretendió estudiar los cambios que se producen con bajos niveles de ATP extracelulares previos a los tratamientos pertinentes. En la **figura 33** observamos que cuando tratamos las células con tenofovir se produce un aumento de la expresión de la fosforilación de ERK1/2 ($75 \pm 9\%$ más que el basal vs $50 \pm 17\%$ de aumento con respecto al control con RANKL, $p < 0,05$; **Fig. 33**). Dipyridamol no es capaz de revertir el efecto de tenofovir en la fosforilación de ERK1/2 (**Fig. 33**). El mismo efecto se observó en p38, aumentando su fosforilación al tratar con tenofovir ($80 \pm 6\%$ más que el basal vs $52 \pm 3\%$ de aumento con respecto al control con RANKL, $p < 0,05$; **Fig. 33**). En este caso, dipiridamol consiguió reducir la fosforilación de p38 pero sin ser significativo este cambio de expresión (**Fig. 33**).

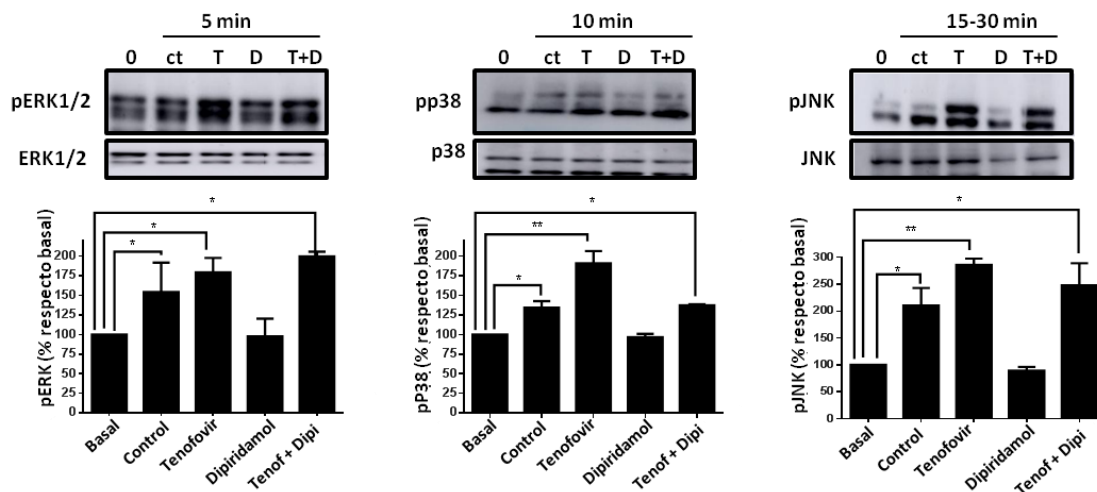


Figura 33. El pre-tratamiento previo con tenofovir activa la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK durante la diferenciación de osteoclastos; no pudiendo revertir dipiridamol este efecto. Se estudiaron MAPK durante la diferenciación de osteoclastos (estimulación de 5 a 30 minutos) en presencia de tenofovir 1 μ M solo o en combinación con dipiridamol 1 μ M. Para normalizar la carga de proteínas, las membranas se incubaron con ERK2, p38 o JNK, respectivamente. Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=5 experimentos independientes). * $p < 0,05$ vs Control, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ (ANOVA). Ct: control, T: tenofovir, D: dipiridamol, T+D/Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

A diferencia de lo observado en los experimentos de diferenciación con pre-tratamiento con dipiridamol, tenofovir es capaz de aumentar la fosforilación de JNK con respecto al basal, más aún que en el caso de las células tratadas solamente con RANKL ($150 \pm 5\%$ más que el basal vs $100 \pm 12\%$ de aumento con respecto al basal para RANKL, $p < 0,05$; **Fig.**

33). Dipiridamol, igualmente a lo que sucede con ERK1/2 y p38, no consigue revertir tal efecto. La combinación de ambos tratamientos desvelan que en este experimento dipiridamol no es capaz de revertir el efecto completo propiciado por tenofovir en la fosforilación de las MAPKs y la propia diferenciación osteoclástica (Fig. 33). Para determinar la captación celular y el metabolismo de tenofovir estudiamos su efecto en la señalización celular de NFκB. Determinamos los niveles de p50/105 citoplasmáticos y nucleares después de tratar previamente con tenofovir durante 30 minutos. Curiosamente, dipiridamol tampoco revirtió los cambios en los niveles de NFκB, IκBα y fosfo-IκBα en células que habían sido tratadas previamente con tenofovir (Fig. 34).

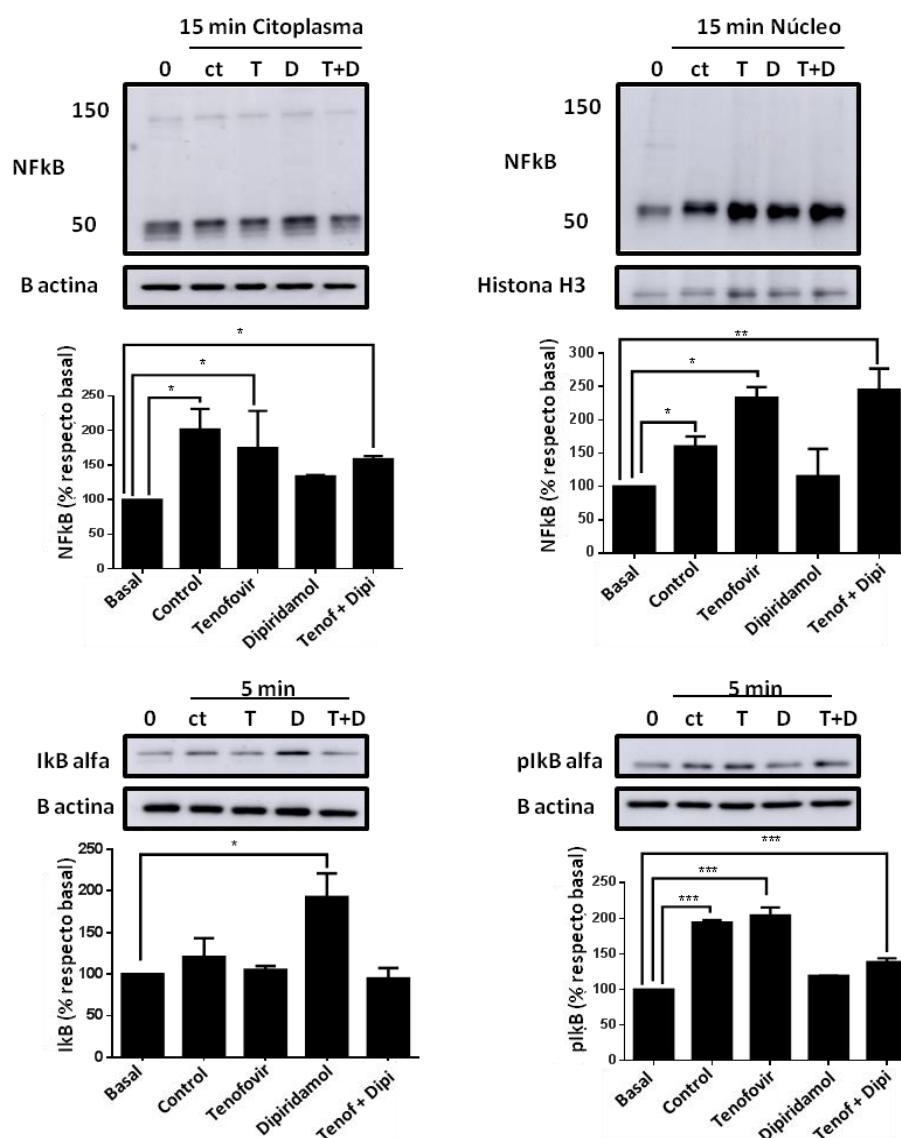


Figura 34. El pre-tratamiento previo con tenofovir activa la translocación nuclear de NFκB durante la diferenciación de los osteoclastos, sin ser revertida por el tratamiento con dipiridamol. Se estudió la translocación nuclear de NFκB p50/p105, IκBα y p-IκBα en presencia de tenofovir 1 μM solo o en combinación con dipiridamol 1 μM. Los resultados mostrados representan las medias ± EEM (N=5 experimentos independientes). * p < 0,05 vs Control, ** p < 0,005, ***p < 0,0001 (ANOVA). Ct: control, T: tenofovir, D: dipiridamol, T+D/Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

2.1.4. Tenofovir inhibe la diferenciación de osteoblastos *in vitro* y su efecto es revertido por dipiridamol.

Para conocer si la alteración ósea producida por tenofovir se debe únicamente a su actuación sobre los osteoclastos, o también tendría algún efecto en osteoblastos, se realizó el estudio de diferenciación de osteoblastos a partir de células estromales de médula ósea murina tratadas con tenofovir, dipiridamol y la combinación de ambos. La diferenciación de los osteoblastos se estudió mediante tinción con rojo de alizarina. Observamos que tenofovir inhibió la diferenciación de osteoblastos de manera dosis dependiente ($IC_{50}=0,4 \mu M$) y que el tratamiento con dipiridamol revirtió este efecto ($EC_{50}= 10 \text{ nM}$; **Fig. 35 A**). Además, estudios de expresión génica indicaron que tenofovir indujo un aumento muy importante de la expresión de RANKL a los 7 días con respecto al control. Así mismo, el tratamiento produjo la disminución de la expresión del ARN mensajero de OPG progresivamente a los 7 y 14 días de diferenciación (**Fig. 35 B**). El tratamiento con dipiridamol revirtió los efectos producidos por tenofovir, manteniéndose la expresión de RANKL muy próxima a la del control tanto a los 7 como 14 días y aumentando exponencialmente OPG a lo largo del experimento (**Fig. 35 B**).

Por otro lado, se tiene certeza de que la activación de β -catenina es esencial para la diferenciación de los osteoblastos y su función [153]. Por lo tanto, estudiamos si la expresión de estas proteínas se veía modificada por el tratamiento con tenofovir y si había cambios en cuanto a la translocación al núcleo de β -catenina. Según lo observado por western blot (**Fig. 36**) e inmunofluorescencia (**Fig. 37**) para β -catenina total y β -catenina no fosforilada (activa), ambas se mantuvieron elevadas en la fracción citoplasmática cuando se trató con tenofovir y disminuyeron en la fracción nuclear 15 minutos después del tratamiento [18% de disminución con respecto control para β -catenina total, 33% de disminución para β -catenina no fosforilada (activa); $p<0,05$]; revirtiéndose tal efecto en presencia de dipiridamol [60% de incremento con respecto a tenofovir para β -catenina total, 25% en el caso de β -catenina no fosforilada (activa); $p=0,05$] (**Fig. 36 A-B, Fig. 37 A-B**). En cambio, para β -catenina fosforilada en Ser552 (no canónica) no se observaron cambios significativos con los tratamientos en cuanto a su expresión proteica nuclear (**Fig. 36 C**) y tampoco en cuanto a la localización celular (**Fig. 37 C**).

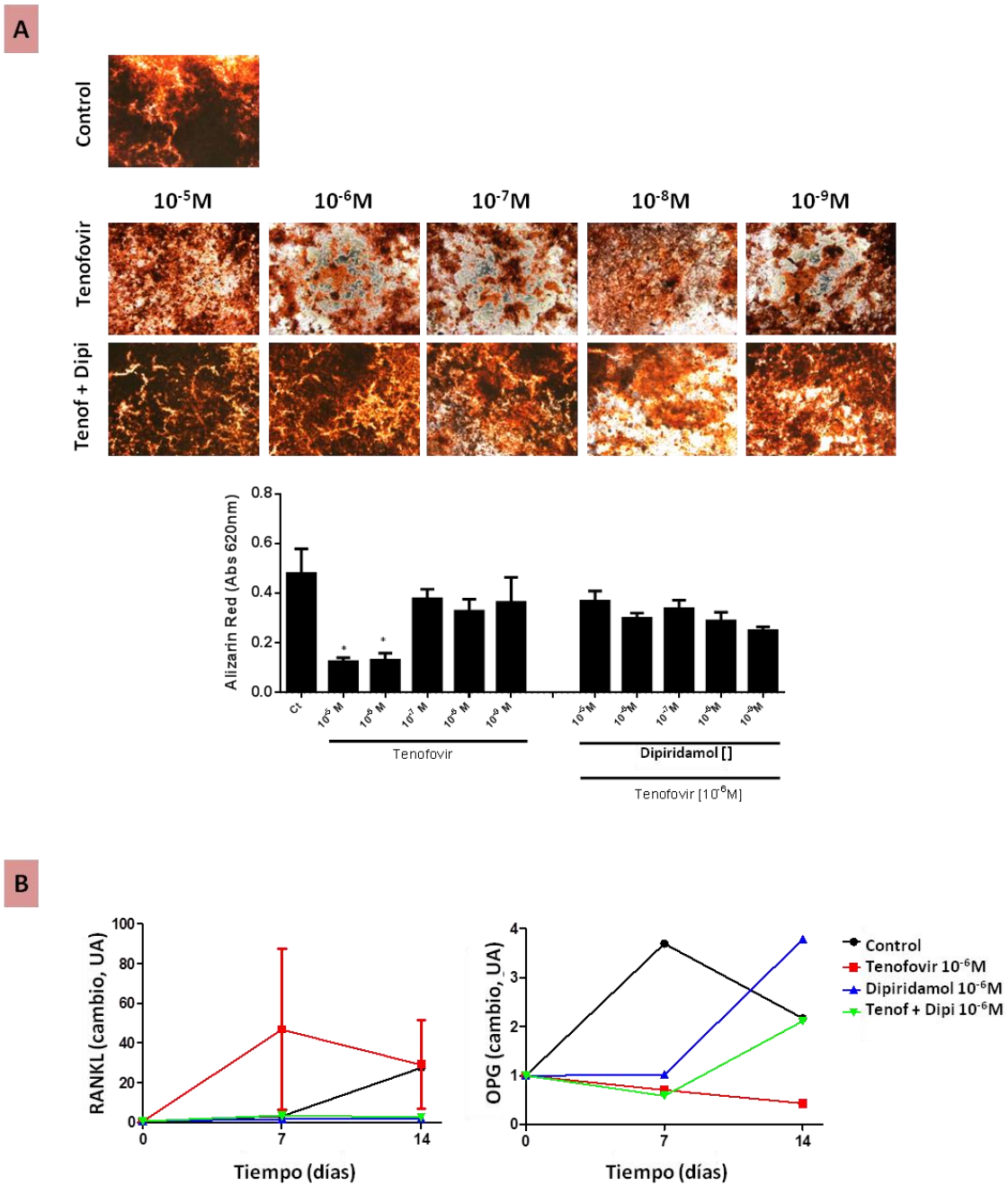


Figura 35. Tenofovir induce la pérdida de diferenciación de osteoblastos a través de un mecanismo relacionado con el transporte de ATP; siendo tal efecto revertido por dipiridamol. (A) Los osteoblastos de origen murino se fijaron y se tiñeron para rojo de alizarina después de cultivarlos en presencia de tenofovir (10 μ M a 1 nM) solo o en combinación con dipiridamol (10 μ M a 1 nM). Las imágenes se cuantificaron por intensidad de color de la tinción. **(B)** Cambios en el ARNm de RANKL y OPG durante el proceso de diferenciación de los osteoblastos en presencia de tenofovir 1 μ M solo o en combinación con dipiridamol 1 μ M. Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=5 experimentos independientes por duplicado). *p < 0,05 vs Control (ANOVA). Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

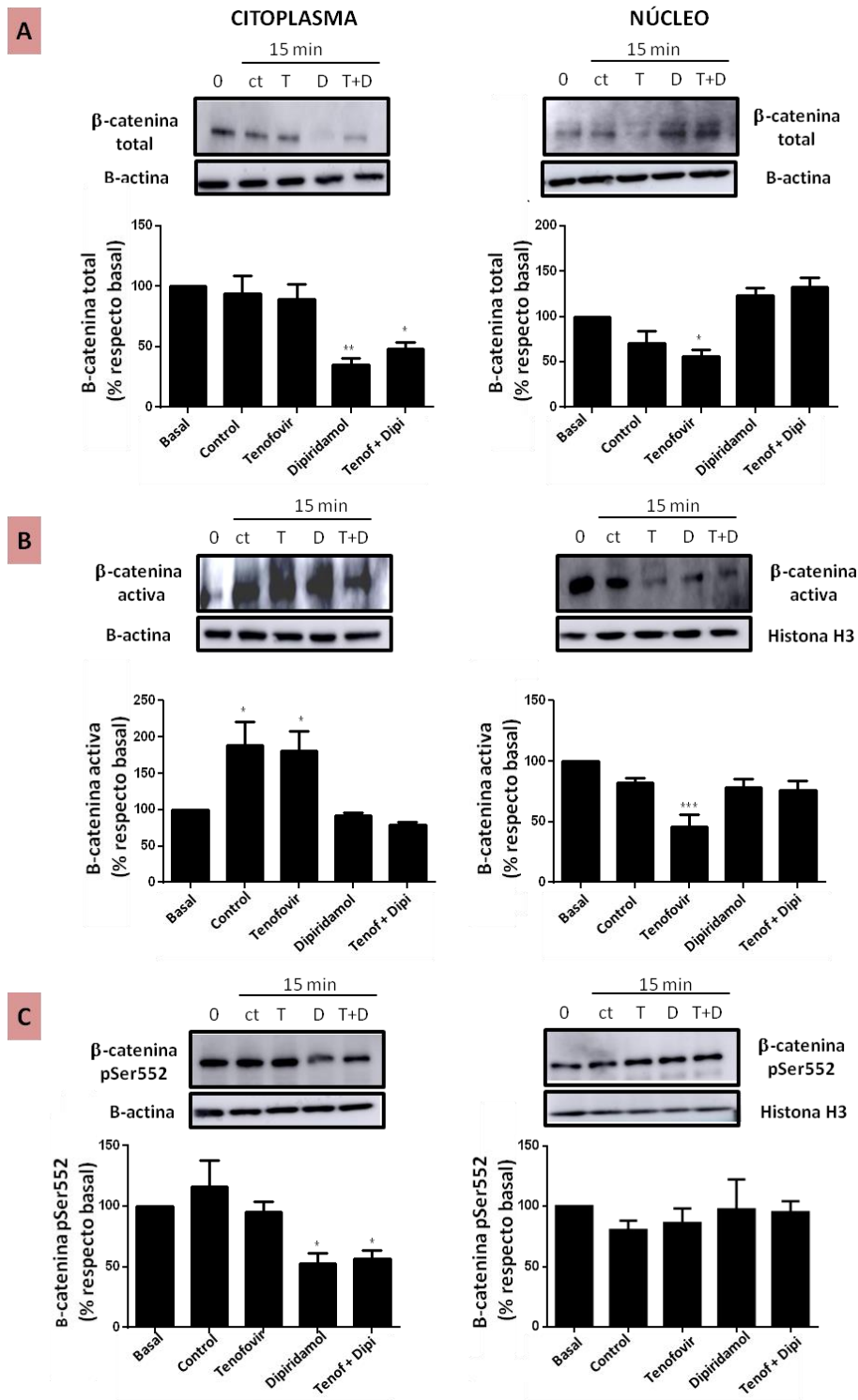


Figura 36. Expresión proteica de β-catenina en osteoblastos murinos tratados con tenofovir y dipiridamol. Se estudió la translocación nuclear de β-catenina total (A), β-catenina activa (B) y β-catenina no canónica (fosforilada en Ser552) (C) en presencia de tenofovir 1 μM solo o en combinación con dipiridamol 1 μM. Los resultados mostrados representan las medias ± EEM (N=5 experimentos independientes). * p < 0,05 vs Control, ** p < 0,005, ***p < 0,0001 (ANOVA). Ct: control, T: tenofovir, D: dipiridamol, T+D/Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

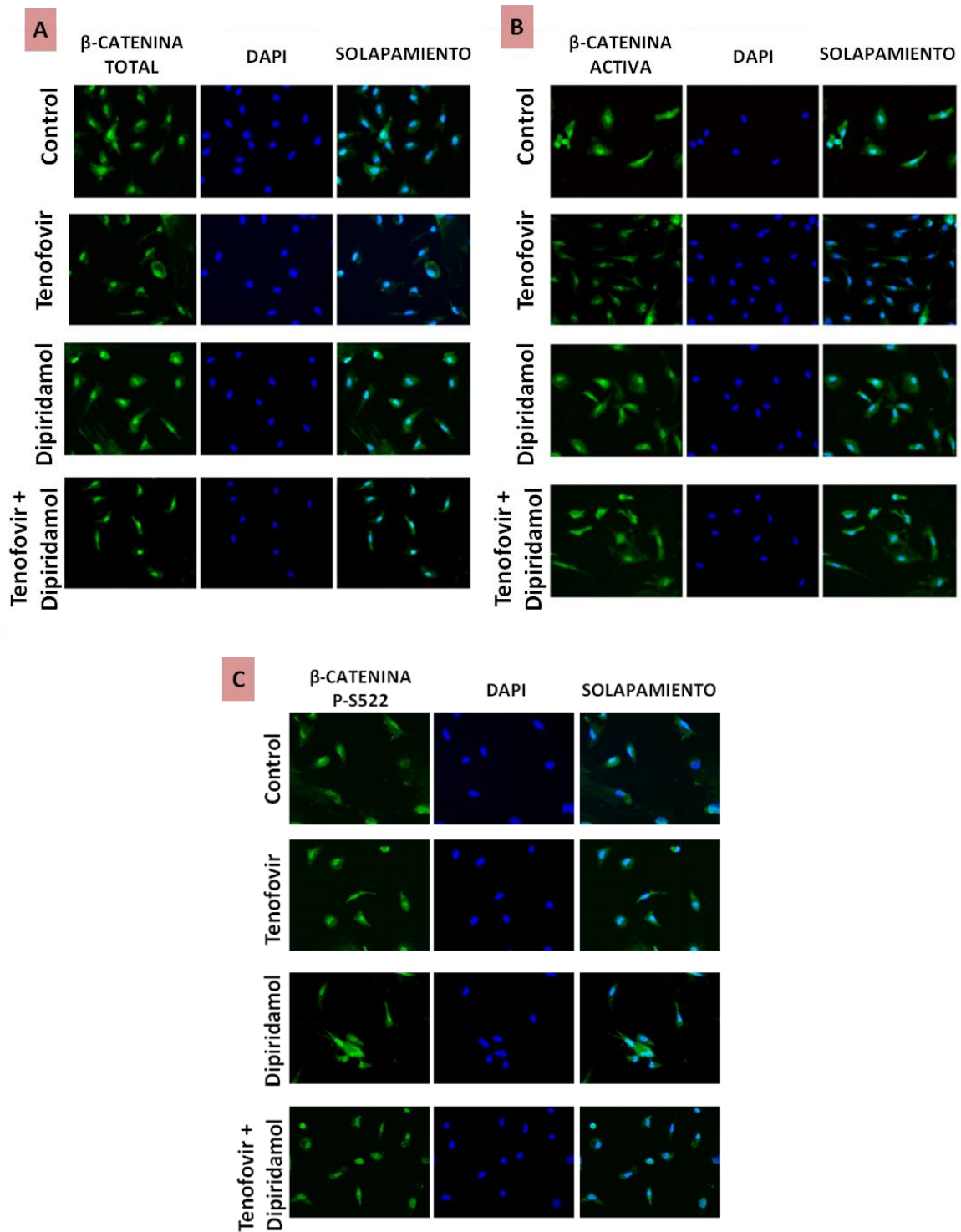


Figura 37. Translocación al núcleo de β -catenina durante la diferenciación de los osteoblastos, tratados con tenofovir y dipiridamol. Se estudió la translocación nuclear de β -catenina total (A), β -catenina activa (B) y β -catenina no canónica (fosforilada en Ser552) (C) en presencia de tenofovir 1 μ M solo o en combinación con dipiridamol 1 μ M. Se muestran imágenes representativas para β -catenina total, β -catenina activa y β -catenina no activa (fosforilada en Ser552) (verde). Los núcleos se muestran en azul (Dapi). Los resultados mostrados representan las medias \pm EEM (N=5 experimentos independientes). Aumento: 40X.

2.2. RESULTADOS IN VIVO.

2.2.1. El tratamiento con tenofovir indujo la pérdida de peso y grasa corporal, disminución de la DMO y alteración de la micro-arquitectura ósea en ratones macho *wild type*, sin verse cambios en los congéneres A_{2A}KO.

Como se describe en el apartado 2.1.1., tenofovir estimula la diferenciación de los osteoclastos; por lo tanto, postulamos que se podría inducir osteopenia debido a la modulación negativa del recambio óseo y reducción de la formación de hueso. Para desarrollar nuestra hipótesis, tratamos ratones C57Bl/6 *wild type* macho con tenofovir, dipiridamol y la combinación de los dos. Observamos que los ratones tratados con tenofovir (75 mg/kg/día) perdieron casi el 10% del peso corporal ($p < 0,001$); sin embargo, ésta pérdida se contrarrestó cuando los ratones fueron tratados con tenofovir en combinación con dipiridamol (25 mg/kg/día) (**Fig. 38 A**). Estos resultados fueron corroborados por DEXA, la cual demostró que los ratones tratados con tenofovir registraron un descenso del 18% en peso ($p < 0,05$) y una reducción significativa en el porcentaje de grasa corporal ($p < 0,05$). En los ratones tratados con dipiridamol observamos que la pérdida de peso no superó el 3% con respecto al control y la grasa corporal se mantuvo en torno a 3,5 gramos (muy similar a la observada en los ratones control) (**Fig. 38 B**). El tratamiento conjunto con ambos fármacos demostró que dipiridamol consiguió contrarrestar la pérdida observada cuando tratamos con tenofovir (**Fig. 38 B**). El escaneo densitométrico también reveló una disminución en la densidad mineral ósea cuando se trataron los ratones con tenofovir ($0,045 \pm 0,001 \text{ g/cm}^2$ vs $0,049 \pm 0,0004 \text{ g/cm}^2$ para control, $p < 0,05$; **Fig. 38 C**), y el tratamiento posterior con dipiridamol invirtió el cambio. Se obtuvieron resultados similares para el contenido mineral óseo (**Fig. 38 C**).

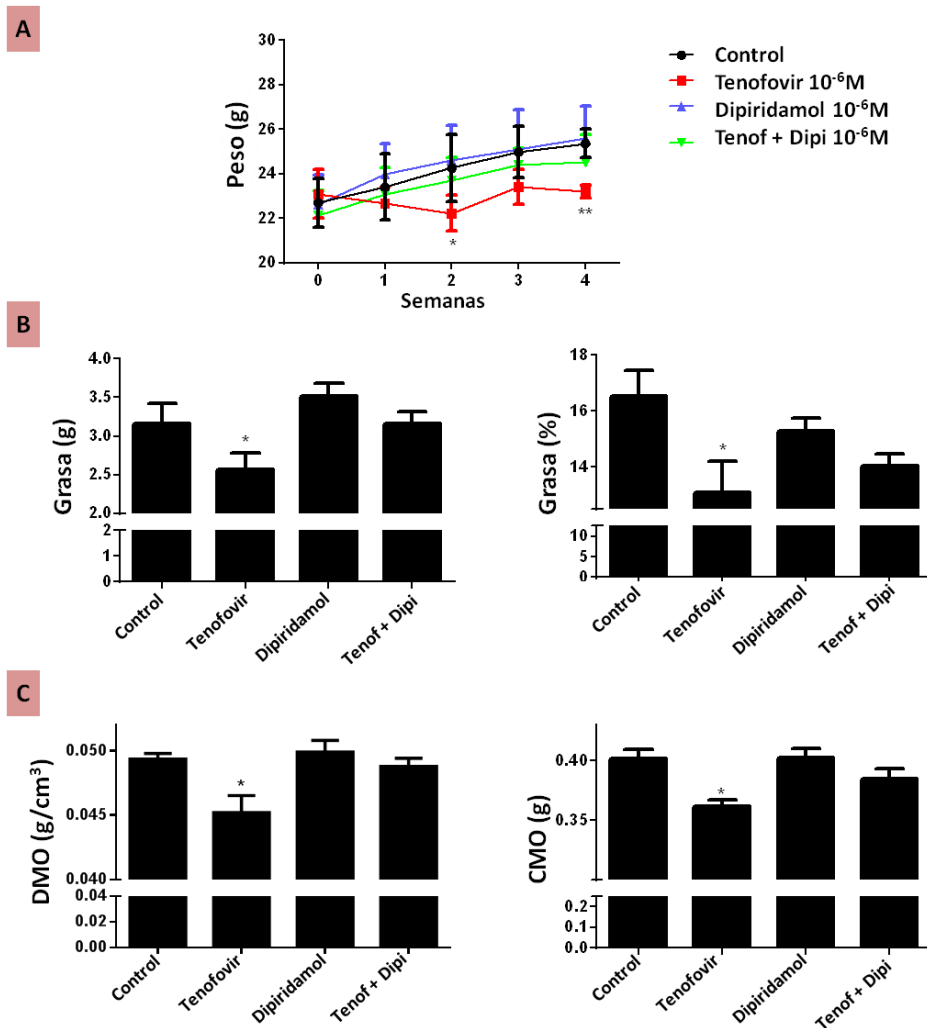


Figura 38. Tenofovir induce la pérdida de peso, disminuye la DMO y promueve la reducción de la grasa corporal en ratones macho *wild type*. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: solución salina al 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 4 semanas. **(A)** Medida semanal del peso. **(B)** Exploración mediante DEXA y resultados de grasa (g) y el % de grasa corporal en todos los grupos. **(C)** Exploración mediante DEXA y análisis de DMO (g/cm³) y el CMO (g) en todos los grupos. Los datos se expresan como media EEM. *p <0,05 vs Control (ANOVA). N= 7 control, N= 7 tenofovir, N= 6 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

Paralelamente, cuando se estudiaron los datos de peso y grasa corporal en los ratones macho *knockeados* para el gen del A_{2A}R se observó que los ratones control registraron pesos un 5% por encima de los ratones tratados con tenofovir, sin verse cambios significativos entre los tratamientos (**Fig. 39 A-B**). Al estudiar mediante DEXA los fémures de los ratones A_{2A}KO, observamos que en cuanto a la DMO y CMO no hay cambios significativos entre los tratamientos con tenofovir y dipiridamol y la combinación de ambos (**Fig. 39 C**).

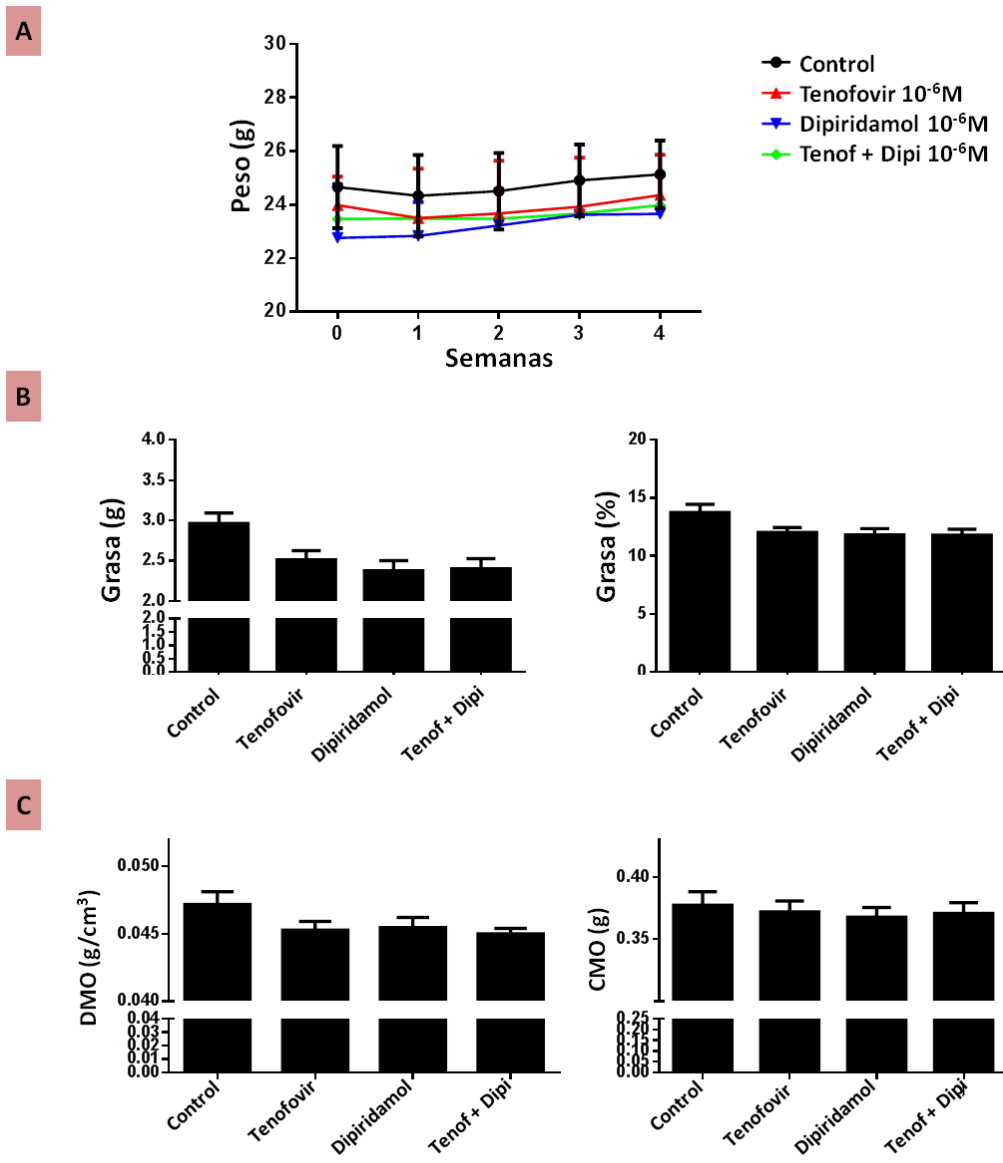


Figura 39. Los ratones macho A_{2A}KO no presentaron cambios en su peso, así como tampoco en el contenido mineral óseo y densidad mineral ósea. Los ratones A_{2A}KO macho se dividieron en cuatro grupos: solución salina al 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 4 semanas. **(A)** El peso se midió semanalmente. **(B)** Se realizó una exploración DEXA y se analizó la media grasa (g) y el % de grasa corporal en todos los grupos. **(C)** Se realizó DEXA y se analizó la DMO (g/cm³) y el CMO (g) en todos los grupos. Los datos se expresan como media EEM; (ANOVA). N= 5 control, N= 6 tenofovir, N= 5 dipiridamol, N= 5 tenofovir + dipiridamol. Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

Por otro lado, para determinar la naturaleza de la pérdida ósea estudiamos la microarquitectura ósea del fémur por microCT. Como se muestra en **la figura 40 A** y en **la Tabla 7**, el volumen y cantidad de hueso cortical y trabecular disminuyeron cuando tratamos los animales macho *wild type* con tenofovir. La pérdida de densidad y contenido mineral óseo fue más evidente y mayor en la porción de hueso trabecular. Se comprobó que tenofovir provocó una

reducción en el volumen total de hueso (TV) y la relación del volumen óseo/volumen total (BV / TV; $p < 0,05$) (**Tabla 7**). La microCT reveló, además, que los ratones tratados con tenofovir tenían una disminución significativa en el número de trabéculas (Tb. N; $p < 0,005$), mayor espacio entre las mismas (Tb. Sp; $p < 0,05$) y disminución importante en la densidad mineral ósea ($p < 0,05$); en comparación con ratones control sin tratamiento (**Tabla 7**). El co-tratamiento con dipiridamol revertido todos los cambios deletéreos observados.

MicroCT HUESO CORTICAL				
PARÁMETROS	CONTROL (n=7)	TENOFOVIR (n=7)	DIPIRIDAMOL (n=6)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=6)
DMO (g/cm³)	1,2 ± 0,01	1,02 ± 0,14	1,24 ± 0,005	1,24 ± 0,01
TV (mm³)	1,21 ± 0,03	1,07 ± 0,02 *	1,2 ± 0,04	1,19 ± 0,03
BV (mm³)	0,5 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,01
BV/TV (%)	45,39 ± 0,35	42,16 ± 0,17 *	43,53 ± 0,52	41,29 ± 0,61
MicroCT HUESO TRABECULAR				
PARÁMETROS	CONTROL (n=7)	TENOFOVIR (n=7)	DIPIRIDAMOL (n=6)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=6)
DMO (g/cm³)	0,76 ± 0,01	0,68 ± 0,01 **	0,8 ± 0,02	0,83 ± 0,01
TV (mm³)	5,09 ± 0,1	4,38 ± 0,08 ***	5,47 ± 0,1	5,75 ± 0,19
BV (mm³)	0,69 ± 0,07	0,41 ± 0,03 **	0,6 ± 0,06	0,56 ± 0,03
BV/TV (%)	12,97 ± 1,26	8,79 ± 0,45 **	12,74 ± 1,33	10,84 ± 0,51
Tb. Th (mm)	0,055 ± 0,002	0,04 ± 0,001	0,05 ± 0,002	0,045 ± 0,002
Tb. Sp (mm)	0,2 ± 0,004	0,24 ± 0,003 *	0,21 ± 0,006	0,23 ± 0,004
Tb. N. (mm⁻¹)	2,5 ± 0,13	1,75 ± 0,07 **	2,44 ± 0,11	2,31 ± 0,08

Tabla 7. Resultados del análisis por microCT de fémures de ratones macho *wild type* tratados con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos. Análisis por microCT de hueso cortical y trabecular en fémur de ratones macho *wild type* usando Skyscan 1172 microCT (media ± EEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ vs Control (ANOVA).

En el caso de los ratones A_{2A}KO, como se muestra en **la figura 40 B** y en **la Tabla 8**, el volumen y cantidad de hueso cortical no varió entre tratamientos significativamente. A nivel de hueso trabecular, los parámetros de remodelado y estructuración trabecular no mostraron cambios significativos entre tratamientos, salvo para el Tb.Sp (**Tabla 8**). Aunque, la reconstrucción 3D del hueso trabecular de los animales tratados con tenofovir parece reflejar

una disminución en el entramado trabecular (**Fig. 41 B**), viéndose un mayor espaciado entre trabéculas (Tb. Sp.) en los animales tratados con tenofovir (**Tabla 8**).

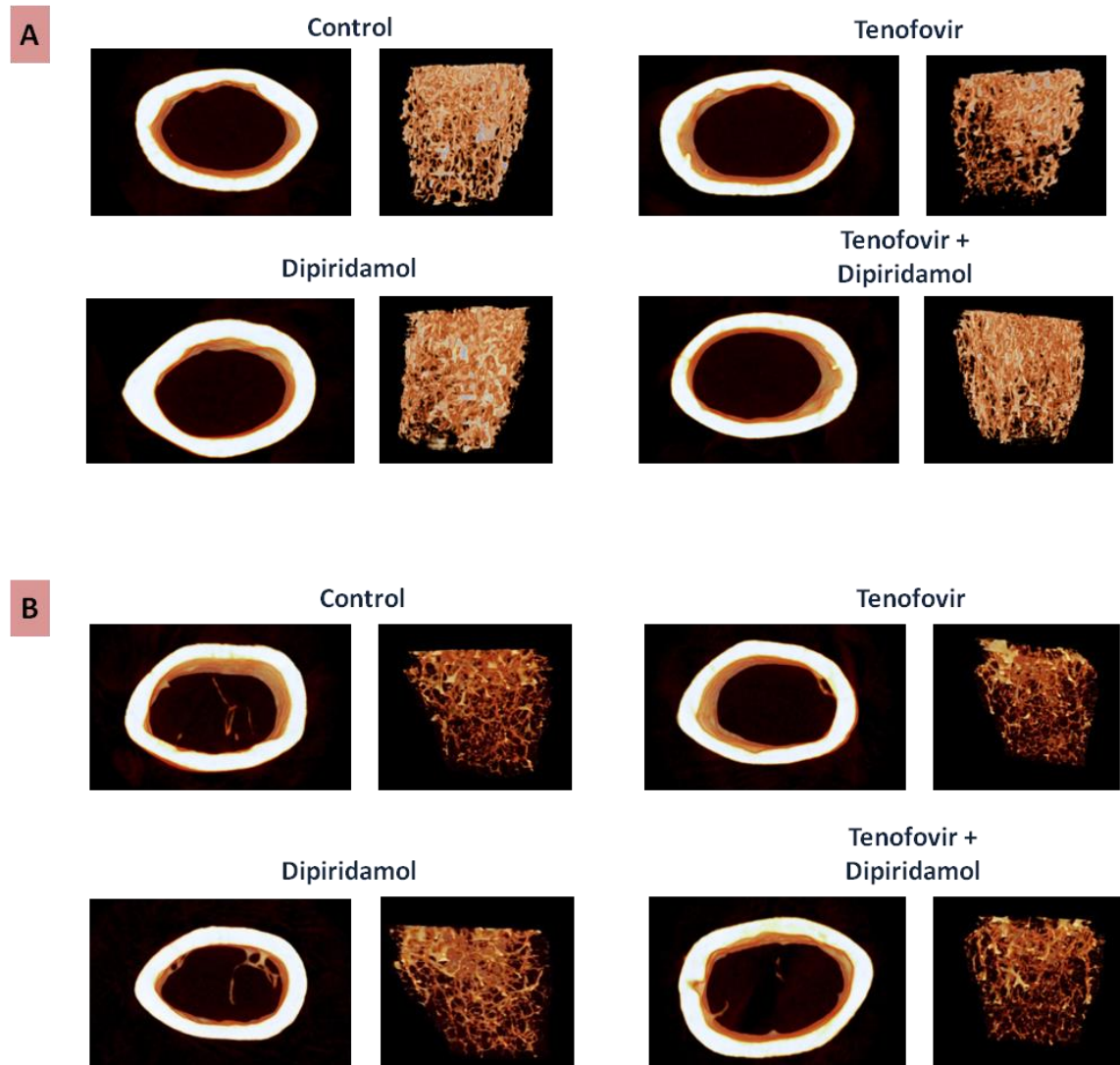


Figura 40. Cambios en la microarquitectura ósea producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratones macho *wild type* y $A_{2A}KO$. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: solución salina al 0,9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día, y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 4 semanas. **(A)** Imágenes representativas de microCT de hueso cortical y trabecular en la parte media del fémur de los ratones macho *wild type*. N= 7 control, N= 7 tenofovir, N= 6 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. **(B)** Imágenes representativas de microCT de hueso cortical y trabecular en la parte media del fémur de los ratones macho $A_{2A}KO$. N= 5 control, N= 6 tenofovir, N= 5 dipiridamol, N= 5 tenofovir + dipiridamol.

MicroCT HUESO CORTICAL				
PARÁMETROS	CONTROL (n=5)	TENOFOVIR (n=6)	DIPIRIDAMOL (n=5)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=8)
<i>DMO (g/cm³)</i>	0,886 ± 0,004	0,888 ± 0,005	0,871 ± 0,013	0,873 ± 0,008
<i>TV (mm³)</i>	1,080 ± 0,032	1,099 ± 0,031	1,181 ± 0,117	1,070 ± 0,014
<i>BV (mm³)</i>	0,467 ± 0,019	0,479 ± 0,015	0,508 ± 0,039	0,439 ± 0,011
<i>BV/TV (%)</i>	43,277 ± 0,973	43,624 ± 0,393	43,369 ± 1,186	41,024 ± 0,559
MicroCT HUESO TRABECULAR				
PARÁMETROS	CONTROL (n=5)	TENOFOVIR (n=6)	DIPIRIDAMOL (n=5)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=8)
<i>DMO (g/cm³)</i>	0,359 ± 0,006	0,372 ± 0,007	0,364 ± 0,021	0,380 ± 0,015
<i>TV (mm³)</i>	4,778 ± 0,144	4,843 ± 0,136	4,759 ± 0,093	5,136 ± 0,104
<i>BV (mm³)</i>	0,357 ± 0,045	0,369 ± 0,054	0,361 ± 0,060	0,310 ± 0,016
<i>BV/TV (%)</i>	7,395 ± 0,729	7,508 ± 0,875	7,520 ± 1,085	6,021 ± 0,262
<i>Tb. Th (mm)</i>	0,040 ± 0,002	0,042 ± 0,02	0,040 ± 0,001	0,040 ± 0,001
<i>Tb. Sp (mm)</i>	0,231 ± 0,007	0,235 ± 0,006 *	0,235 ± 0,010	0,262 ± 0,004 #
<i>Tb. N. (mm⁻¹)</i>	1,850 ± 0,131	1,756 ± 0,129	1,876 ± 0,215	1,511 ± 0,049

Tabla 8. Resultados del análisis por microCT de fémures de ratones macho A_{2A}KO tratados con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos. Análisis por microCT de hueso cortical y trabecular en fémur de ratones macho A_{2A}KO usando Skyscan 1172 microCT (media ± EEM). &p <0,05 Tenofovir vs T+D, # p <0,05 Control vs T+D (ANOVA).

2.2.2. Tenofovir produjo el aumento de expresión de marcadores de resorción ósea *in vivo* a nivel histológico en ratones macho *wild type*, viéndose revertido esta acción por dipiridamol. No se vieron cambios histológicos en el modelo A_{2A}KO.

El examen histológico indicó que hubo un aumento en el número de osteoclastos teñidos con TRAP en la metafisis femoral de ratones macho *wild type* tratados con tenofovir (83 ± 31 osteoclastos / área de análisis vs 27 ± 1 osteoclastos / área de análisis para los ratones control, p <0,05). Este incremento se revirtió cuando los ratones se trataron con dipiridamol (30 ± 2 osteoclastos / área de análisis, p<0,005 vs tenofovir; **Fig. 41 A**). Al igual que para los congéneres *wild type*, los huesos largos de los ratones A_{2A}KO se procesaron y se realizó la correspondiente tinción con TRAP (**Fig. 41 B**). No vimos cambios significativos en el número de osteoclastos activos entre tratamientos en el modelo A_{2A}KO.

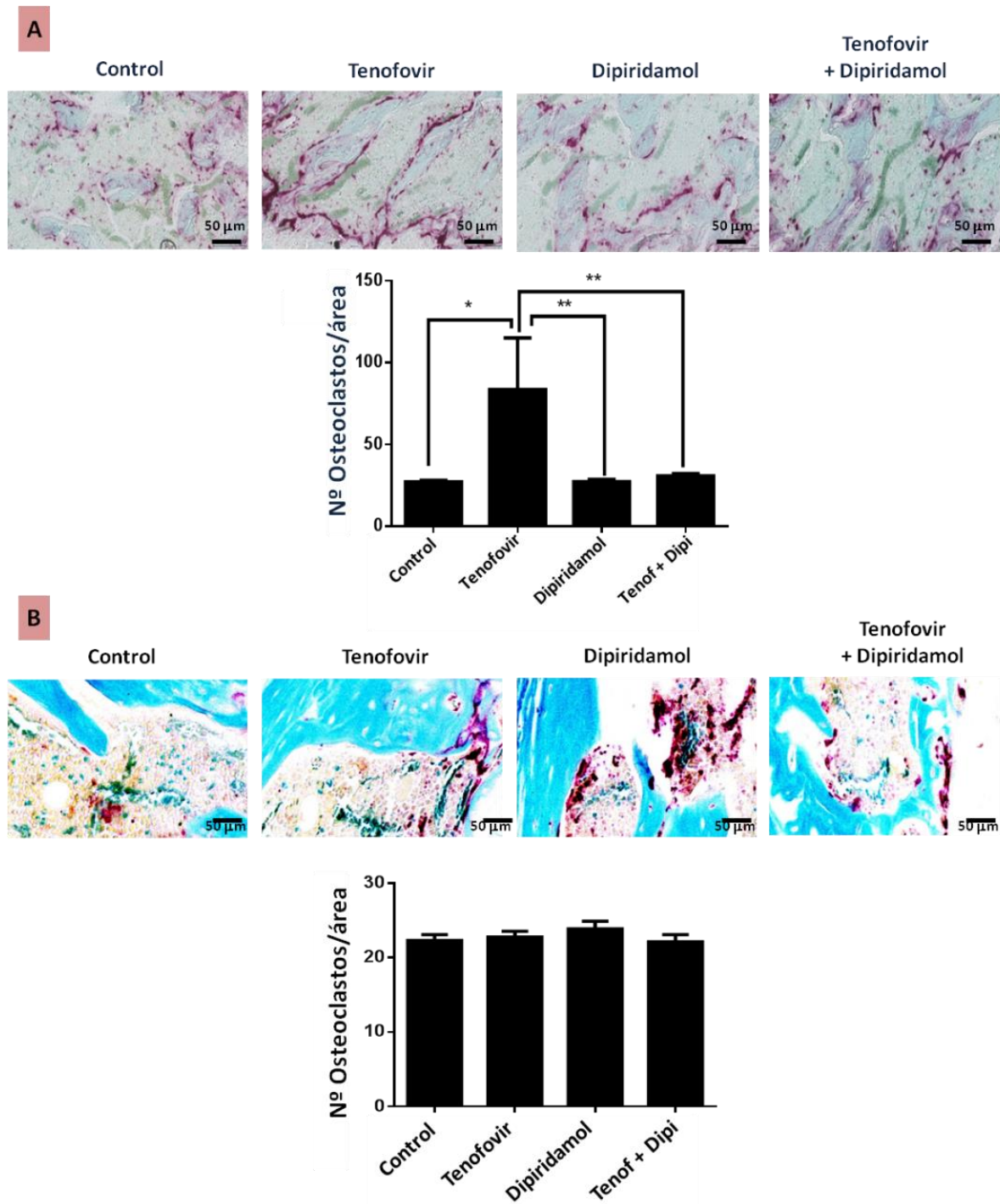


Figura 41. Cambios en el remodelado óseo producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratones macho *wild type* y $A_{2A}KO$. (A) Imágenes representativas de la tinción con TRAP para osteoclastos en el fémur de ratones macho *wild type* y el número medio de osteoclastos por área (medidas tomadas en 2 campos diferentes por muestra). N= 10 control, N= 10 tenofovir, N= 9 dipiridamol, N= 9 tenofovir + dipiridamol. (B) Imágenes representativas de la tinción con TRAP para osteoclastos en el fémur de ratones macho $A_{2A}KO$ y el número medio de osteoclastos por área (medidas tomadas en 2 campos diferentes por muestra). N= 8 control, N= 8 tenofovir, N= 8 dipiridamol, N= 8 tenofovir + dipiridamol. *p <0,05, **p <0,005 ***p <0,0001 vs control (ANOVA). Escala: 50 μ m. Aumento: 40X. Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

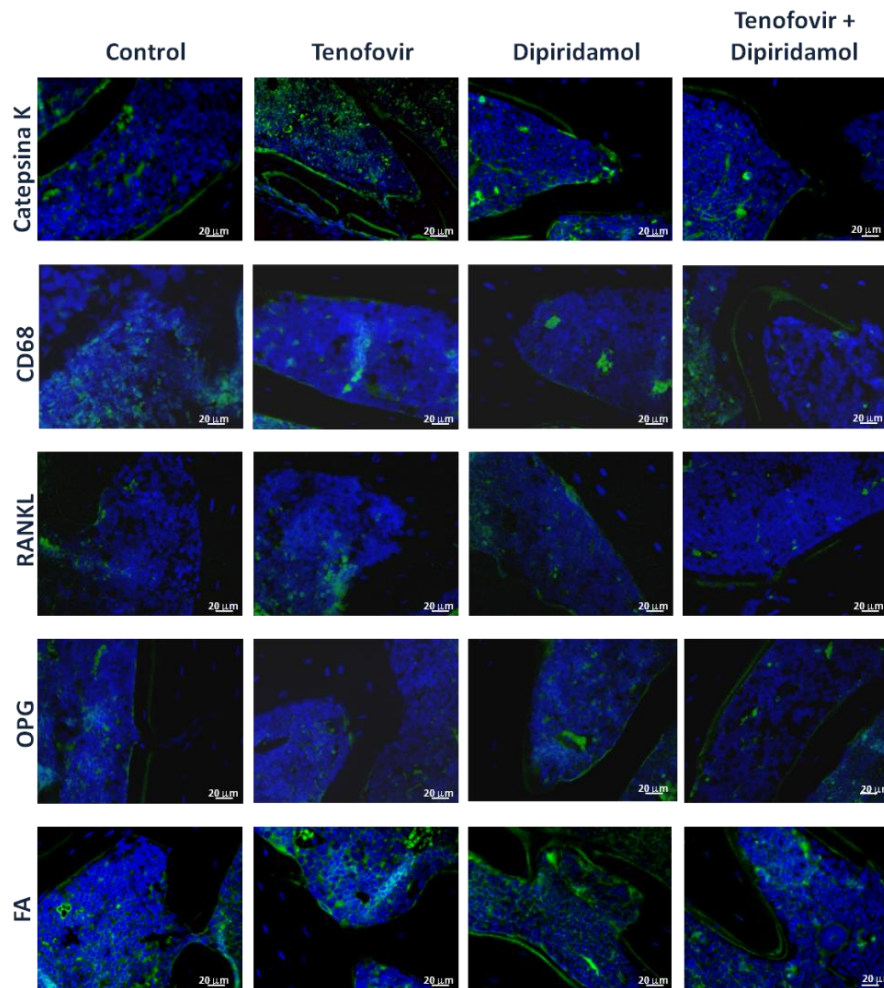


Figura 42. Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratones *wild type* macho. Se procesaron huesos largos y se realizó inmunofluorescencia de los diferentes marcadores de remodelado óseo. Se muestran imágenes representativas para catepsina K, CD68, RANKL, osteoprotegerina y fosfatasa alcalina (verde). Los núcleos se muestran en azul (Dapi). N= 10 control, N= 10 tenofovir, N= 9 dipiridamol, N= 9 tenofovir + dipiridamol. Escala: 20 μ m. Aumento: 40X.

Por su parte, mediante inmunofluorescencia, corroboramos los resultados observados. Cuando los osteoclastos se identificaron mediante tinción inmunohistológica para la catepsina K (**Fig. 42**), observamos un aumento de la expresión en los tejidos de ratones tratados con tenofovir, revirtiéndose tal efecto con dipiridamol. También estudiamos la presencia de macrófagos (células CD68 positivo), comprobando que seguían una tendencia similar a catepsina K (**Fig. 42**). Otros de los marcadores de remodelado óseo estudiados por inmunofluorescencia fue RANKL, el cual experimentó un aumento en su expresión en las muestras de ratones tratadas con tenofovir. Por su parte, la expresión de OPG en los tejidos de ratones tratados con tenofovir disminuyó considerablemente, recuperándose significativamente su expresión con dipiridamol (**Fig. 42**). De forma sorprendente, las células

FA-positivas (fosfatasa alcalina, marcador anabólico de osteoblastos) no cambiaron en cuanto a expresión con los diferentes tratamientos (**Fig. 42**), sugiriendo que la disminución de la densidad y volumen óseo es resultante de un aumento de la resorción ósea.

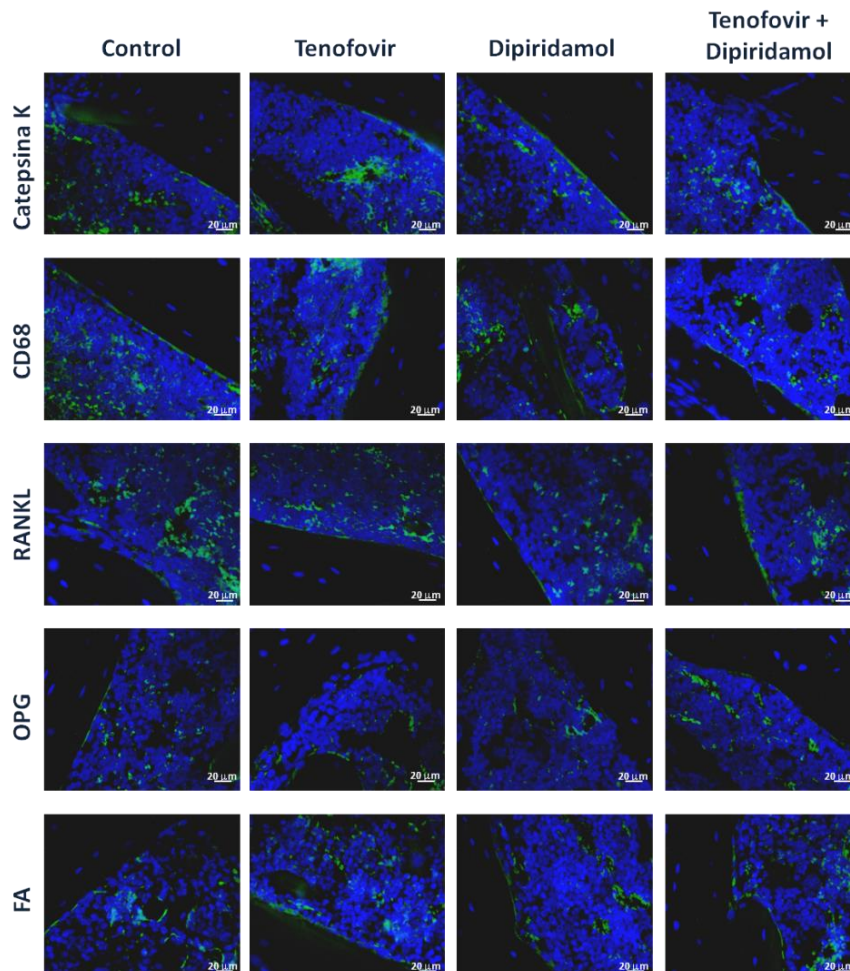


Figura 43. Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratones macho $A_{2A}KO$. Se procesaron huesos largos y se realizó inmunofluorescencia de los diferentes marcadores de remodelado óseo. Se muestran imágenes representativas para catepsina K, CD68, RANKL, osteoprotegerina y fosfatasa alcalina (verde). Los núcleos se muestran en azul (Dapi). N= 8 control, N= 8 tenofovir, N= 8 dipiridamol, N= 8 tenofovir + dipiridamol. Escala: 20 μm . Aumento: 40X.

Al igual que para los congéneres *wild type*, los huesos largos de los ratones $A_{2A}KO$ se procesaron y se realizó la correspondiente tinción inmunohistológica (**Fig. 43**). La tinción de inmunofluorescencia mostró que los ratones tratados con tenofovir tuvieron una señal aumentada del marcador de osteoclastos catepsina K. La tinción con RANKL también se incrementó en los animales tratados con tenofovir con una disminución concomitante en la expresión de OPG. Por su parte, CD68 (marcador de macrófagos) y FA no cambiaron significativamente con los diferentes tratamientos. En estos ratones, dipiridamol no fue capaz

de cambiar la expresión de los marcadores en estudio debido a la ausencia del receptor A_{2A} (Fig. 43).

2.2.3. El tratamiento con tenofovir indujo la pérdida de peso y grasa corporal, disminución de la DMO y alteración de la micro-arquitectura ósea en ratonas OVX *wild type*, sin verse cambios en los congéneres $A_{2A}KO$.

Al igual que hicimos con los ratones macho (apartado 2.2.1), tratamos ratonas ovariectomizadas con tenofovir, dipiridamol y la combinación de los dos fármacos. En el modelo de ratones macho estudiamos principalmente el efecto directo de tenofovir en el remodelado óseo, mientras que en el modelo de hembras ovariectomizadas se intentó recrear un estado osteoporótico en el animal, tratando de simular lo que ocurriría en el paciente con VIH y osteopenia. Comparando con los ratones control (OVX tratadas con salino 0,9%) y sham (manipuladas sin extirpación de ovarios), observamos que las ratonas tratadas con tenofovir (75 mg/kg/día) perdieron en torno al 15% del peso corporal a lo largo de las 5 semanas de tratamiento ($p < 0,001$); sin embargo, ésta pérdida se ve contrarrestada cuando las ratonas fueron tratadas con la combinación de tenofovir y dipiridamol (25 mg/kg/día) (Fig. 44 A). El DEXA de cuerpo completo demostró, además, que las ratonas tratadas con tenofovir registraron un descenso del 18% en peso ($p < 0,05$) y un reducción significativa en el porcentaje de grasa corporal ($p < 0,05$). En las ratonas tratadas con dipiridamol observamos que la pérdida de peso y grasa corporal no fue tan abrupta (Fig. 44 B). Los datos encontrados en el peso y grasa corporal se asemejan a la evolución que encontramos en los ratones macho estudiados, poniendo de manifiesto el efecto directo de tenofovir en el metabolismo de los ratones.

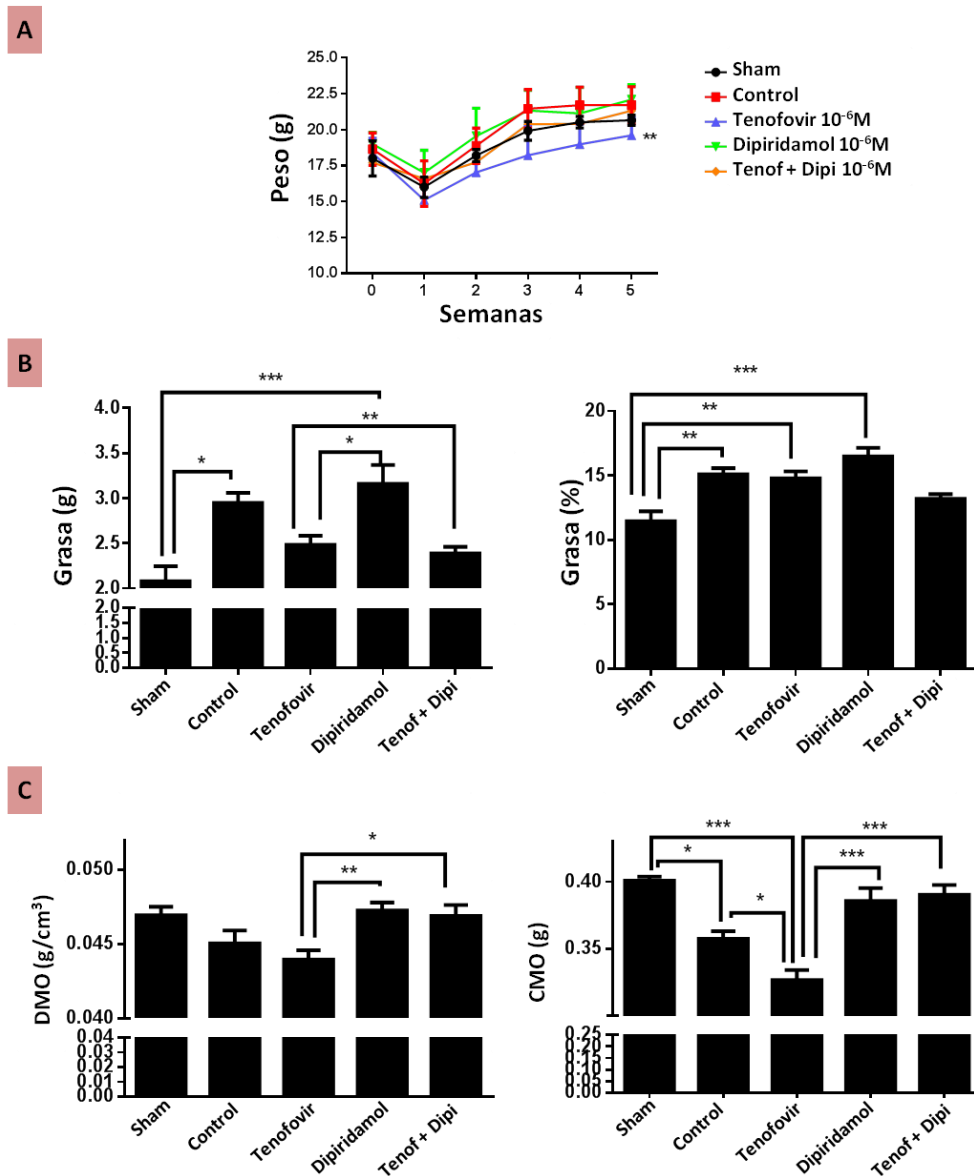


Figura 44. Tenofovir indujo la pérdida de peso, disminuyó la DMO y promovió la reducción de la grasa corporal en ratonas OVX *wild type*, sin verse revertido tal efecto por dipiridamol. Las ratonas se dividieron en cinco grupos: sham, solución salina al 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 5 semanas. **(A)** El peso se midió semanalmente. **(B)** Se realizó una exploración DEXA y se analizó la media grasa (g) y el % de grasa corporal en todos los grupos. **(C)** Se realizó DEXA y se analizó la DMO (g/cm³) y el CMO (g) en todos los grupos. N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 6 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. Los datos se expresan como media ± EEM. * p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,001 vs Control (ANOVA). Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

El escaneo densitométrico también reveló una disminución en la DMO cuando se trataron las ratonas con tenofovir (Tabla 9, Fig. 44 C), y el tratamiento posterior con dipiridamol invirtió el cambio. Se obtuvieron resultados similares para el CMO (Tabla 9, Fig. 44

C). En este último caso observamos una disminución muy marcada del contenido mineral óseo en los ratones tratados con tenofovir con respecto a sham (**Fig. 44 C**).

<i>MicroCT HUESO CORTICAL</i>					
PARÁMETROS	SHAM (n=3)	CONTROL (n=6)	TENOFOVIR (n=6)	DIPIRIDAMOL (n=6)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=6)
DMO (g/cm ³)	1,299 ± 0,007	1,272 ± 0,016	1,255 ± 0,006	1,273 ± 0,006	1,255 ± 0,004 ***
TV (mm ³)	1,045 ± 0,023	1,104 ± 0,018	1,023 ± 0,021	1,059 ± 0,014	1,088 ± 0,029
BV (mm ³)	0,486 ± 0,01	0,473 ± 0,016	0,438 ± 0,011	0,457 ± 0,012	0,466 ± 0,019
BV/TV (%)	46,521 ± 0,679	42,886 ± 1,189	42,840 ± 1,196	43,207 ± 0,906	42,810 ± 0,951
<i>MicroCT HUESO TRABECULAR</i>					
PARÁMETROS	SHAM (n=3)	CONTROL (n=6)	TENOFOVIR (n=6)	DIPIRIDAMOL (n=6)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=6)
DMO (g/cm ³)	0,151 ± 0,003	0,100 ± 0,006 +	0,093 ± 0,006 €	0,126 ± 0,012	0,126 ± 0,006 &
TV (mm ³)	4,466 ± 0,185	4,598 ± 0,094	4,312 ± 0,144	4,607 ± 0,042	4,727 ± 0,126
BV (mm ³)	0,308 ± 0,028	0,184 ± 0,013 +	0,132 ± 0,01 €	0,271 ± 0,037 \$	0,279 ± 0,021 &
BV/TV (%)	6,879 ± 0,346	4,014 ± 0,310 +	3,088 ± 0,279 €	5,873 ± 0,784 \$	5,876 ± 0,363 &
Tb. Th (mm)	0,048 ± 0,002	0,043 ± 0,001 +	0,042 ± 0,001 €	0,045 ± 0,001	0,044 ± 0,001 &
Tb. Sp (mm)	0,298 ± 0,003	0,339 ± 0,021	0,389 ± 0,027	0,372 ± 0,029	0,365 ± 0,029
Tb. N. (mm ⁻²)	1,437 ± 0,121	0,924 ± 0,064	0,733 ± 0,067 €	1,301 ± 0,168 \$	1,350 ± 0,084 &

Tabla 9. Resultados del análisis por microCT de fémures de ratonas OVX *wild type* tratadas con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos. Análisis por microCT de hueso cortical y trabecular en fémur de ratonas OVX *wild type* usando Skyscan 1172 microCT. Los datos se expresan como media ± EEM (n = 10 por grupo). % Sham vs T+D p <0,05, + Sham vs Control p <0,05, € Sham vs Tenofovir p <0,005, \$ Tenofovir vs Dipiridamol p <0,005, & Tenofovir vs T+D *** p <0,005 vs control (ANOVA).

En la **tabla 9** se recogen los datos de microCT tanto de hueso cortical como trabecular. Se observó un descenso significativo de la DMO en las ratonas tratadas con tenofovir, así como cambio deletéreos en hueso trabeculares. Se redujo significativamente el número de trabéculas, a la vez que éstas fueron más delgadas y con mayor separación entre ellas. Estos efectos deletéreos se revirtieron con dipiridamol, aumentando el número de trabéculas significativamente con respecto a las tratadas con tenofovir.

Al igual que observamos en los ratones macho A_{2A}KO, cuando estudiamos los datos de peso y grasa corporal en las ratonas silenciados para el gen del A_{2A}R observamos que las ratonas control registraron pesos un 5% por encima de las ratonas tratadas con tenofovir, sin

verse cambios significativos entre los tratamientos. De igual modo, no observamos cambios en la grasa corporal de las ratonas de los diferentes grupos (**Fig. 45 A-B**). En cuanto a la medida densitométrica de DMO y CMO, observamos que las ratonas tratadas con tenofovir presentan valores más bajos que las ratonas control (no siendo significativo el cambio), no viéndose revertido el efecto resortivo por dipiridamol (**Fig. 45 C**). A nivel trabecular se aprecian cambios que no llegan a ser significativos en los parámetros de remodelado óseo cuando tratamos con tenofovir, viéndose reducido tanto BV (**Tabla 10**) como BV/TV (**Tabla 10**), sin revertirse eficazmente con dipiridamol (**Tabla 10**).

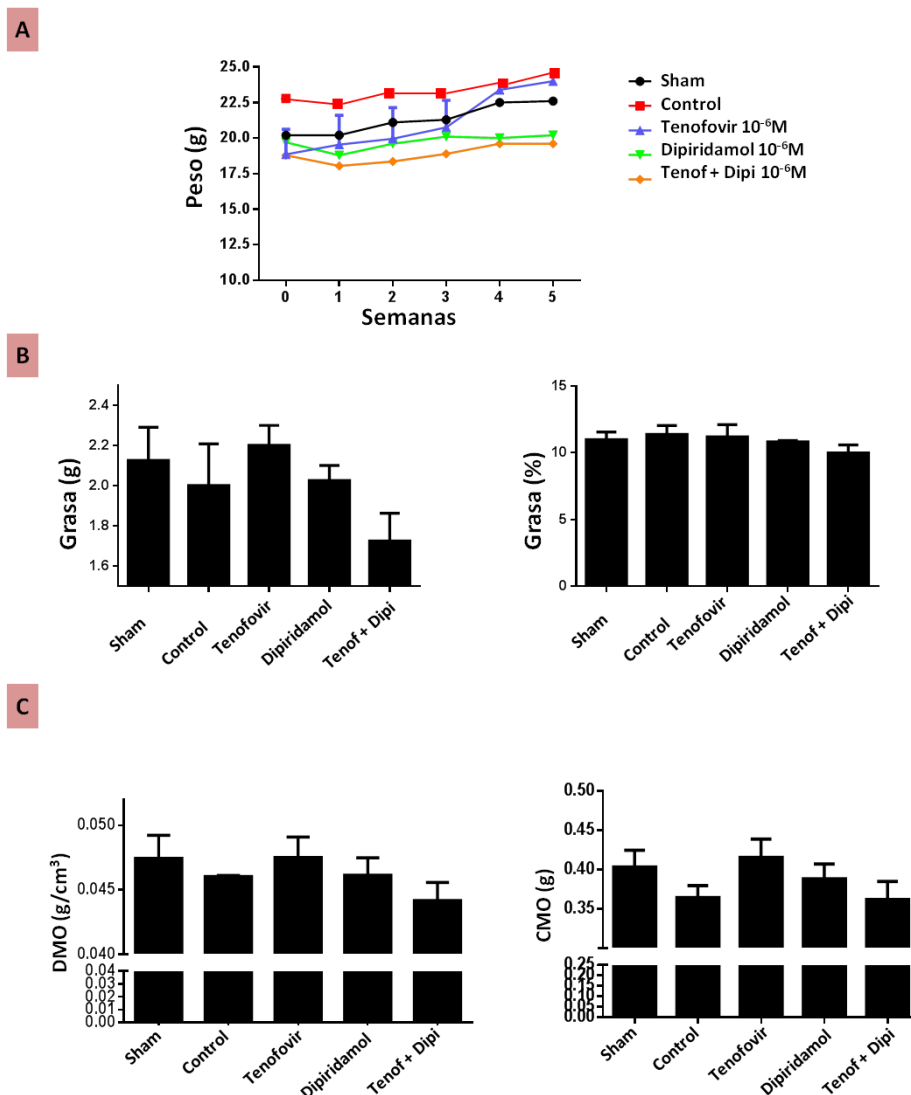


Figura 45. Las ratonas OVX A₂AKO no presentaron cambios significativos en su peso, así como en el contenido mineral óseo y densidad mineral ósea. Las ratonas se dividieron en cinco grupos: sham, solución salina al 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 4 semanas. **(A)** El peso se midió semanalmente. **(B)** Se realizó una exploración DEXA y se analizó la media grasa (g) y el % de grasa corporal en todos los grupos. **(C)** Se realizó DEXA y se analizó la DMO (g/cm³) y el CMO (g) en todos los grupos. Los datos se expresan como media ± EEM. N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol. Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

MicroCT HUESO CORTICAL					
PARÁMETROS	SHAM (n=4)	CONTROL (n=3)	TENOFOVIR (n=2)	DIPIRIDAMOL (n=4)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=4)
<i>DMO (g/cm³)</i>	0,890 ± 0,004	0,877 ± 0,012	0,890 ± 0,012	0,896 ± 0,008	0,882 ± 0,011
<i>TV (mm³)</i>	1,024 ± 0,035	0,968 ± 0,046	1,055 ± 0,003	1,059 ± 0,031	0,990 ± 0,028
<i>BV (mm³)</i>	0,486 ± 0,025	0,431 ± 0,019	0,478 ± 4,67 e-004	0,461 ± 0,02	0,415 ± 0,034
<i>BV/TV (%)</i>	47,374 ± 1,396	44,626 ± 1,372	45,341 ± 0,193	43,498 ± 1,108	41,744 ± 2,296
MicroCT HUESO TRABECULAR					
PARÁMETROS	SHAM (n=4)	CONTROL (n=3)	TENOFOVIR (n=2)	DIPIRIDAMOL (n=4)	TENOFOVIR + DIPIRIDAMOL (n=4)
<i>DMO (g/cm³)</i>	0,439 ± 0,009	0,424 ± 0,016	0,444 ± 0,023	0,425 ± 0,012	0,410 ± 0,011
<i>TV (mm³)</i>	4,290 ± 0,128	4,170 ± 0,219	4,619 ± 0,019	4,654 ± 0,101	4,513 ± 0,036
<i>BV (mm³)</i>	0,171 ± 0,010	0,163 ± 0,013	0,154 ± 0,001	0,189 ± 0,029	0,169 ± 0,009
<i>BV/TV (%)</i>	3,998 ± 0,205	3,909 ± 0,274	3,342 ± 0,001	4,062 ± 0,579	3,755 ± 0,222
<i>Tb. Th (mm)</i>	0,035 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,035 ± 4,20 e-004	0,035 ± 0,002	0,034 ± 0,001
<i>Tb. Sp (mm)</i>	0,302 ± 0,006	0,333 ± 0,009	0,350 ± 0,004	0,324 ± 0,016	0,333 ± 0,010
<i>Tb. N. (mm⁻¹)</i>	1,143 ± 0,039	1,048 ± 0,052	0,955 ± 0,011	1,137 ± 0,123	1,107 ± 0,085

Tabla 10. Resultados del análisis por microCT de fémures de ratonas OVX A_{2A}KO tratadas con tenofovir, dipiridamol o la combinación de ambos. Análisis por microCT de hueso cortical y trabecular en fémur de ratonas OVX A_{2A}KO usando Skyscan 1172 microCT (media ± EEM, n = 10 por grupo) (ANOVA).

En el caso de las ratonas OVX wild type, como se muestra en la **figura 46 A** y en la **tabla 9**, no se vieron cambios significativos entre tratamientos en cuanto a los parámetros corticales; pero si que se evidenció la pérdida de hueso trabecular en las ratonas tratadas con tenofovir (**Fig. 46 A**). Dipiridamol consiguió revertir esta pérdida de hueso trabecular de forma significativa (**tabla 9 y Fig. 46 A**). En cambio, cuando observamos los datos de microCT de los fémures de las ratonas OVX A_{2A}KO, no encontramos cambios significativos entre tratamientos para ningún parámetro cortical ni trabecular (**Fig. 46 B y tabla 10**).

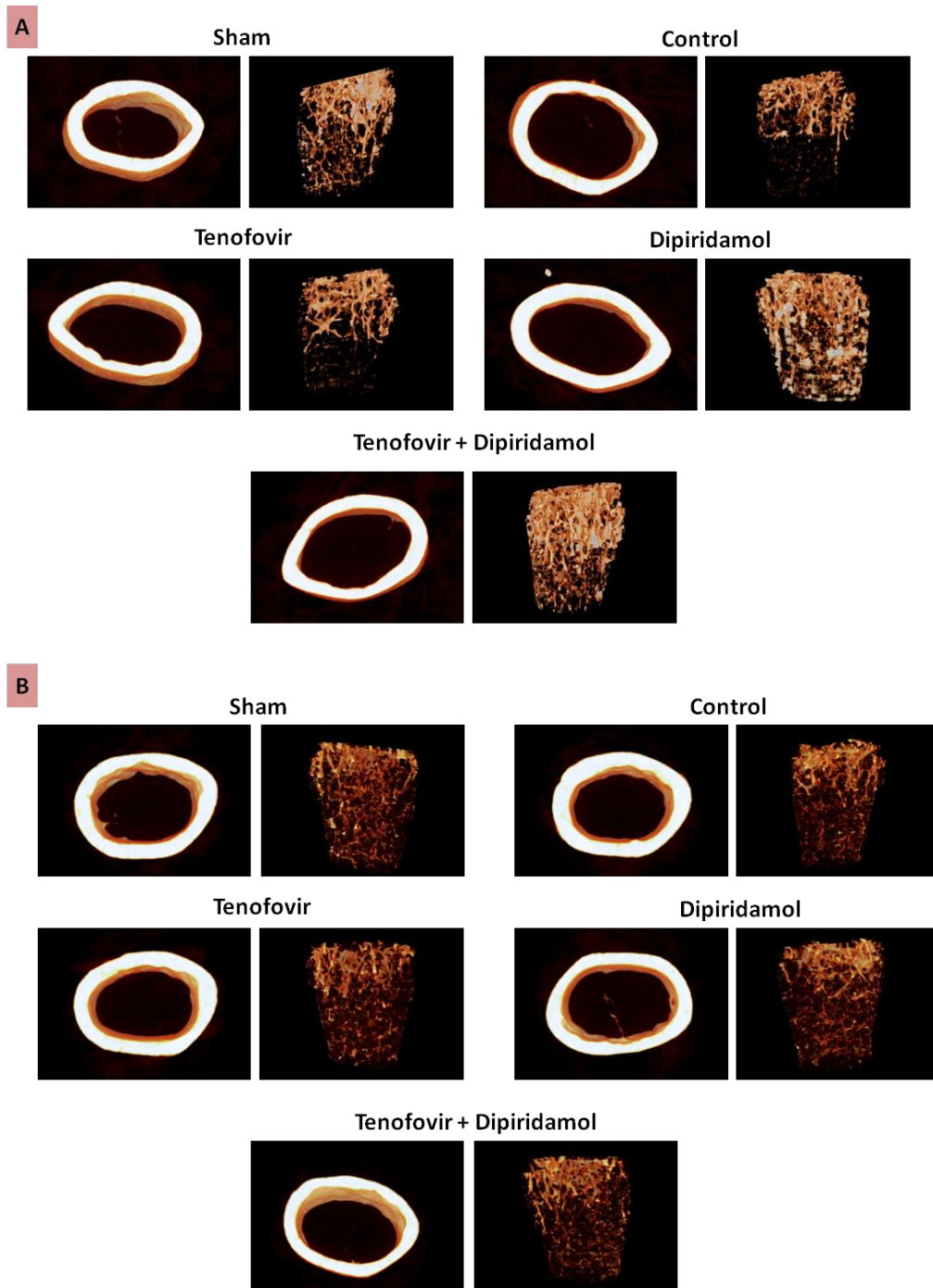


Figura 46. Cambios en la microarquitectura ósea producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratonas OVX *wild type* y $A_{2A}KO$. Las ratonas se dividieron en cinco grupos: sham, solución salina al 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/día, dipiridamol 25 mg/kg/día, combinación de tenofovir 75 mg/kg/día y dipiridamol 25 mg/kg/día durante 4 semanas. **(A)** Imágenes representativas de microCT de hueso cortical y trabecular en la parte media del fémur de las ratonas OVX *wild type*. N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 6 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. **(B)** Imágenes representativas de microCT de hueso cortical y trabecular en la parte media del fémur de las ratonas OVX $A_{2A}KO$. N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol. Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

2.2.4. Tenofovir produjo el aumento de expresión de marcadores de resorción ósea *in vivo* a nivel histológico en ratonas OVX *wild type*, viéndose revertido esta acción por dipiridamol. No se vieron cambios histológicos en el modelo A_{2A}KO.

Al igual que hicimos en el modelo murino de ratones macho, mediante inmunotinción e inmunofluorescencia, corroboramos el aumento de la expresión de marcadores de remodelado óseo involucrados en la diferenciación de los osteoclastos. En el modelo *wild type* se observó un aumento de la expresión de osteoclastos activos [(29 ± 3 osteoclastos / área de análisis vs 25 ± 5 osteoclastos / área de análisis), para las ratonas control, p <0,05] [(29 ± 3 osteoclastos / área de análisis vs 18 ± 10 osteoclastos / área de análisis), para las ratonas sham, p <0,05] (**Fig. 47 A**). Este incremento se revirtió cuando las ratonas se trataron con dipiridamol (19 ± 2 osteoclastos / área de análisis, p<0,005 vs tenofovir; **Fig. 47 A**). No observamos cambios en el número de osteoclastos teñidos con la tinción TRAP en el modelo A_{2A}KO (**Fig. 47 B**).

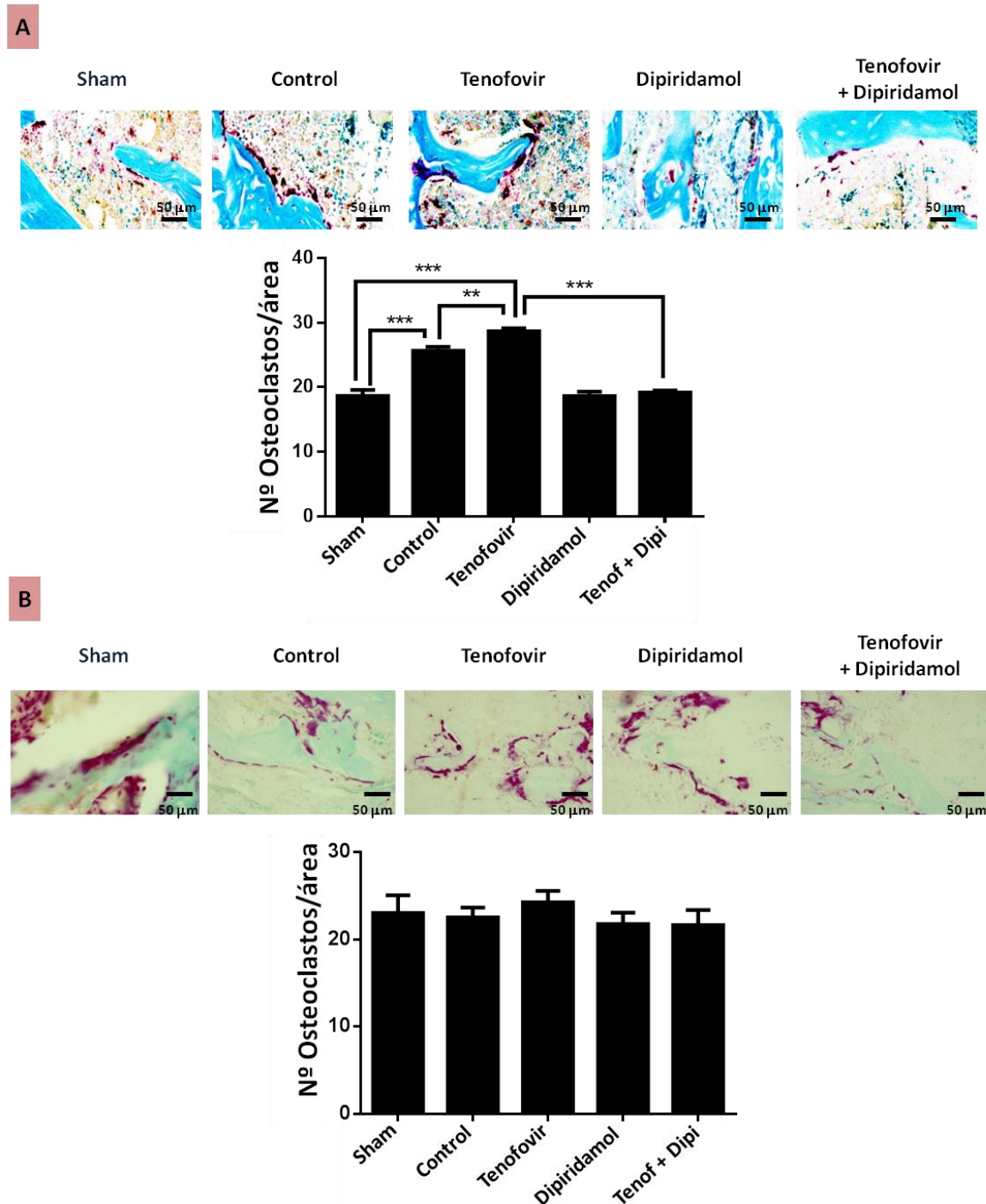


Figura 47. Cambios en el remodelado óseo producidos por tenofovir y dipiridamol *in vivo* en ratonas OVX *wild type* y *A2AKO*. (A) Imágenes representativas de la tinción con TRAP para osteoclastos en el fémur de ratonas OVX *wild type* y el número medio de osteoclastos por área (medidas tomadas en 2 campos diferentes por muestra). N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 7 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. (B) Imágenes representativas de la tinción con TRAP para osteoclastos en el fémur de ratonas OVX *A2AKO* y el número medio de osteoclastos por área (medidas tomadas en 2 campos diferentes por muestra). N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol. Las imágenes fueron tomadas a 40X. Barra de escala indica 50 mm. *p < 0,05, **p < 0,005 ***p < 0,0001 vs control (ANOVA). Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

Cuando los osteoclastos se identificaron mediante tinción inmunohistológica para catepsina K y RANKL (Fig. 48), observamos un aumento de la expresión en los tejidos de las

ratonas tratadas con tenofovir, revirtiéndose tal efecto cuando combinamos el tratamiento con dipiridamol. En cuanto a la expresión de OPG, se observó que el tratamiento con dipiridamol produjo un aumento de su expresión con respecto a las ratonas que recibieron tenofovir. En el caso de CD68 no se vieron cambios significativos en cuanto a su expresión con los diferentes tratamientos. Al igual que para CD68, las células FA-positivas no cambiaron significativamente en cuanto a expresión con los diferentes tratamientos (**Fig. 48**), lo que sugiere una posible disminución de la densidad y volumen óseo resultante de un aumento de la resorción ósea. Este hecho corrobora lo observado en el modelo murino de ratones macho *wild type*.

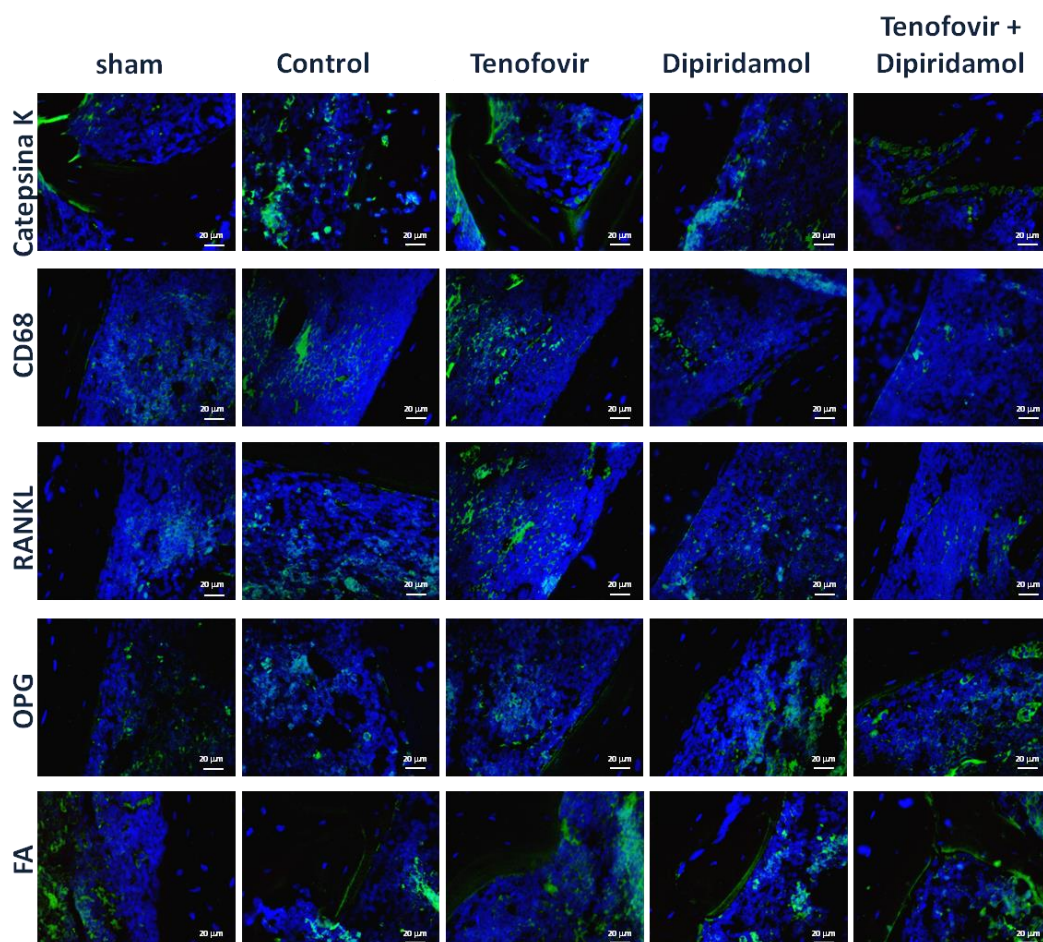


Figura 48. Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratonas OVX *wild type*. Se procesaron huesos largos y se realizó inmunofluorescencia de los diferentes marcadores de remodelado óseo. Se muestran imágenes representativas para catepsina K, CD68, RANKL, osteoprotegerina y fosfatasa alcalina (verde). Los núcleos se muestran en azul (Dapi). N= 3 sham, N= 6 control, N= 6 tenofovir, N= 7 dipiridamol, N= 6 tenofovir + dipiridamol. Escala: 20 μ m. Aumento: 40X.

Como cabría esperar por la ausencia del receptor A_{2A} de adenosina, la expresión de los diferentes marcadores del metabolismo óseo (catepsina K, RANKL, OPG, CD68 y FA) fue muy

homogénea con los diferentes tratamientos aplicados, sin verse cambios significativos entre los ratones tratados con tenofovir y los que recibieron dipiridamol o la combinación de ambos (Fig. 49).

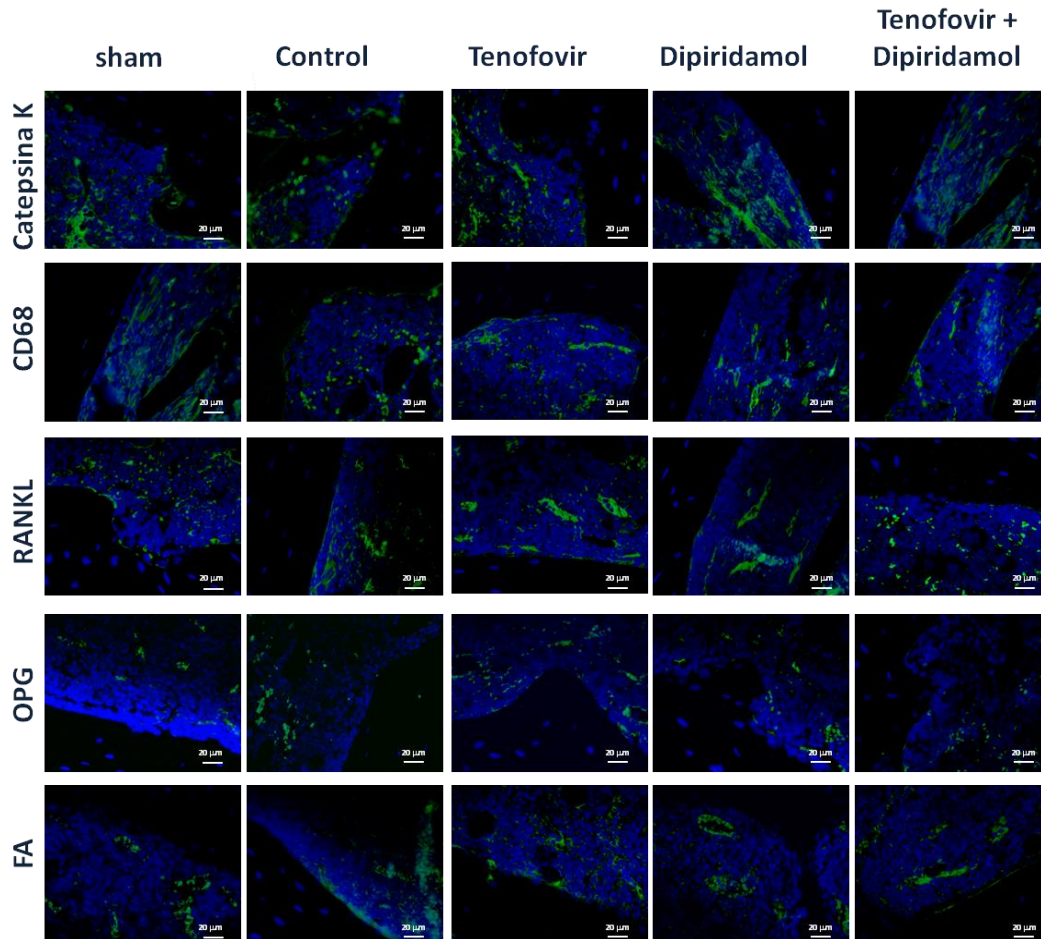


Figura 49. Inmunofluorescencia de marcadores de remodelado óseo en cortes de huesos largos de ratones OVX A_{2A}KO. Se procesaron huesos largos y se realizó inmunofluorescencia de los diferentes marcadores de remodelado óseo. Se muestran imágenes representativas para catepsina K, CD68, RANKL, osteoprotegerina y fosfatasa alcalina (verde). Los núcleos se muestran en azul (Dapi). N= 4 sham, N= 3 control, N= 2 tenofovir, N= 4 dipiridamol, N= 4 tenofovir + dipiridamol. Escala: 20 μm. Aumento: 40X.

2.2.5. El tratamiento con tenofovir no indujo osteomalacia ni cambios en el grosor del osteoide en los modelos murinos *wild type* macho y hembra.

Complementariamente a los experimentos realizados; y debido a que uno de los efectos más comunes de tenofovir descrito en el metabolismo mineral de pacientes con VIH es la hipofosfatemia derivando en osteomalacia [154], medimos los niveles de fósforo en suero en nuestros ratones macho y hembra *wild type* (Fig. 50). No se encontraron cambios significativos en los niveles séricos de fósforo en ratones tratados con tenofovir, dipiridamol y la combinación de los dos.

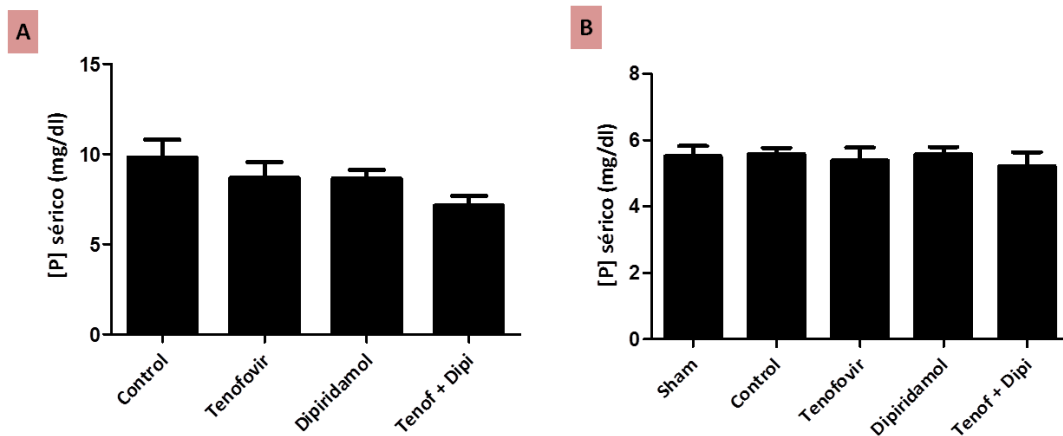


Figura 50. Medidas de fósforo sérico en suero. (A) Medidas de fósforo sérico de ratones macho *wild type*. **(B)** Medidas de fósforo sérico de ratonas OVX *wild type*. Se extrajo sangre e inmediatamente se procesó el suero para su posterior medida con el equipo ADVIA 2400 (Siemens®). Los resultados son la media de los valores \pm EEM (N= 5 animales por grupo). Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

Además, estudiamos el grosor del osteoide bajo doble tinción tricrómica (Fig. 51). No encontramos ninguna diferencia significativa de grosor en ninguno de los animales tratados en comparación con los ratones control, lo que indica que nuestros ratones no sufrían osteomalacia.

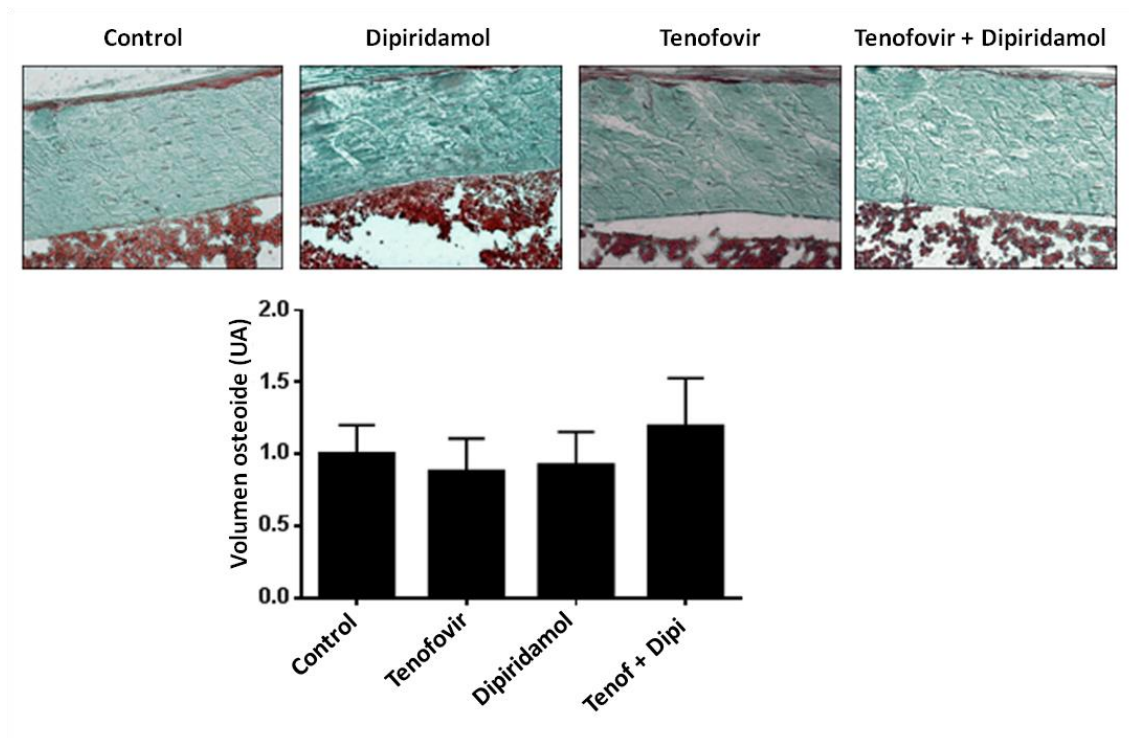


Figura 51. Medida del grosor del osteoide en cortes de huesos largos de ratones macho *wild type*. Imágenes representativas de cada uno de los grupos en estudio. Se representa el corte histológico teñido con tricrómico de Mason del hueso cortical, para la medición del osteoide. Los resultados son la media de los valores \pm EEM (N= 5 animales por grupo). Tenof + Dipi: tenofovir + dipiridamol.

2.3. RESULTADOS IN VIVO EN PACIENTES VIH.

2.3.1. Características epidemiológicas y socio-demográficas de los pacientes con VIH en estudio.

Todos los datos epidemiológicos, socio-demográficos y los parámetros inmunológicos y bioquímicos relacionados con el virus y la infección no se describen en la presente tesis doctoral. Esto es debido a que formaran parte de otra tesis doctoral defendida por una colaboradora clínica que participó en el estudio. Solamente se incluyen y se describen los datos relacionados con el metabolismo y remodelado óseo de los pacientes que recibieron tenofovir en su terapia antirretroviral.

2.3.2. Cambios en los marcadores de remodelado óseo de los pacientes con VIH tratados con tenofovir (TDF y TAF).

Los marcadores de remodelado óseo se analizaron mediante kits multiplex de ELISA en la plataforma Luminex®. Observamos que los pacientes tratados con TDF (tenofovir disoproxil fumarato) y TAF (tenofovir alafenamida) mostraron un perfil osteoclástico más evidente que otros tratamientos sin tenofovir: inhibidores de la proteasa (IP), *abacavir* (inhibidores de nucleósidos (no tenofovir) de la transcriptasa inversa, ABC) e inhibidores de la integrasa + inhibidores de nucleósidos (no tenofovir) de la transcriptasa inversa (*Triumeq*) (estos datos no se muestran debido a que son parte de otra tesis doctoral). El estudio demostró que tras 12 meses de tratamiento, los marcadores óseos estudiados denotan una clara activación de la remodelación ósea hacia un perfil resortivo.

En los pacientes tratados con TDF a los 3 meses observamos que CTX aumenta un 62,1% con respecto al valor basal ($p=0,064$). En el caso de los pacientes tratados con TAF el aumento de CTX fue del 42,6% con respecto a su basal ($p=0,011$). Por otro lado observamos que el P1NP aumentó un 31,7% con respecto al basal en los pacientes tratados con TDF ($p=0,004$) y 3,8% en el caso de los pacientes tratados con TAF ($p=0,243$). En cuanto a la osteocalcina (OC), en el grupo TDF observamos un aumento de 38,6% ($p=0,001$) siendo el aumento del 27,3% en grupo TAF ($p=0,001$). Con respecto al TRAP en el grupo TDF notamos un aumento de 11,1% con respecto a su basal ($p=0,003$) y en el grupo con TAF un aumento del 21% ($p=0,008$). La PTH en el grupo TDF notamos una disminución de un 1,9% ($p=1,000$) y 5,8% ($p=0,934$) en el grupo TAF (**Tabla 11**).

Los parámetros analizados con Luminex® se detallan a continuación. DKK1 se redujo en un 21% ($p=0,098$) en el grupo TDF, y 15,7% en el TAF ($p=0,515$). La osteoprotegerina (OPG) disminuyó en un 23,4% en los pacientes tratados con TDF ($p=0,003$) y un 28,8% en el grupo TAF (0,049). Por otro lado, osteopontina (OPN) aumentó 19,3% con respecto al basal ($p=0,045$) en el grupo TDF y 13,6% en el grupo TAF ($p=0,104$). La esclerostina (SOST) se vio disminuida en un 9,8% en los pacientes tratados con TDF ($p=0,074$) y un 30,5% en el grupo tratado con TAF ($p=0,216$). Finalmente RANKL aumentó un 17,7% ($p=0,61$) en el grupo TDF, sin observarse cambio en el grupo TAF ($p=0,675$) (**Tabla 11**).

A los 12 meses del tratamiento con respecto al estadio basal, observamos que CTX aumentó hasta un 92,3% ($p<0,0001$) en el grupo tratado con TDF, y 28,5% el TAF ($p=0,052$). P1NP aumentó un 81,4% ($p<0,0001$) en el grupo TDF y 17,9% en el grupo TAF ($p=0,021$). Con

respecto a la OC en el grupo TDF observamos un aumento del 49,6% ($p < 0,0001$) en cambio para TAF el incremento fue del 1,6% ($p = 0,0241$). El TRAP aumentó 51,1% en el grupo TDF ($p = 0,002$) y en el grupo TAF observamos un aumento de 120 veces el basal ($p < 0,0001$). La PTH aumentó un 35,8% en los pacientes tratados con TDF ($p = 0,078$), muy similar al incremento observado en el grupo TAF (37,1%; $p = 0,052$) (**Tabla 11**).

Por otro lado, en cuanto a los parámetros medidos por Luminex®, DKK1, OPG, OPN y SOST experimentaron un aumento con respecto al basal del 67,4%, 20,1%, 63,5% y 20,2%, respectivamente ($p = 0,049$, $p = 0,244$, $p = 0,013$ y $p = 0,497$; respectivamente); cuando los pacientes se trataron con TDF. En el caso del grupo tratado con TAF, observamos que DKK1 disminuyó un 12,3% ($p = 0,241$), mientras que OPG, OPN y SOST aumentaron 0,7%, 23,4% y 16,9%, respectivamente ($p = 0,623$, $p = 0,123$ y $p = 0,296$). Finalmente, observamos para ambos grupos de tratamiento un llamativo incremento en RANKL, elevándose en torno a 900 veces con respecto al basal en el grupo TDF y 302 veces en el grupo TAF (**Tabla 11**).

Evolución	Variable	TDF		TAF		p ₂
		Mediana (Q1, Q3)	p ₁	Mediana (Q1, Q3)	p ₁	
Basal-3m	PTH	-1.9 (-37.4, 16.2)	1.000	-5.8 (-18.0, 27.4)	0.934	0.8
	DKK1	-21.0 (-58.0, 3.7)	0.098	-15.7 (-60.1, 25.3)	0.515	0.707
	OPG	-23.4 (-41.5, -9.9)	0.003	-28.8 (-40.4, 2.5)	0.049	0.683
	OPN	19.3 (-3.5, 56.9)	0.045	13.6 (-6.9, 45.1)	0.104	0.552
	SOST	-9.8 (-26.3, 5.0)	0.074	-30.5 (-47.8, 15.1)	0.216	0.88
	RANKL	17.7 (-29.5, 36.6)	0.610	0.0 (-0.2, 23.2)	0.675	0.859
	CTX	62.1 (-6.6, 153.6)	0.064	42.6 (-0.4, 73.7)	0.011	0.635
	P1NP	31.7 (25.7, 50.9)	0.004	3.8 (-15.9, 38.0)	0.243	0.075
	OC	38.6 (22.2, 62.3)	0.001	27.3 (10.8, 62.7)	0.001	0.433
	TRAP	11.1 (7.7, 33.3)	0.003	21.0 (-3.5, 45.5)	0.008	0.564
	Basal-12m	PTH	35.8 (12.3, 67.7)	0.078	37.1 (-9.1, 54.2)	0.052
DKK1		67.4 (-18.2, 166.8)	0.049	-12.3 (-50.5, 17.8)	0.241	0.046
OPG		20.1 (-12.2, 87.6)	0.244	0.7 (-38.5, 54.1)	0.623	0.472
OPN		63.5 (16.5, 169.4)	0.013	23.4 (-19.0, 39.5)	0.123	0.132
SOST		20.2 (-30.0, 88.2)	0.497	16.9 (-37.3, 95.5)	0.296	0.943
RANKL		979.5 (587.7, 1397.0)	0.004	302.0 (-72.2, 1425.0)	0.164	0.278
CTX		92.3 (17.9, 140.0)	0.000	28.5 (3.9, 84.9)	0.052	0.137
P1NP		81.4 (47.5, 98.8)	0.000	17.9 (4.5, 55.5)	0.021	0.057
OC		49.6 (42.7, 77.5)	0.000	1.6 (-10.0, 50.7)	0.241	0.033
TRAP		51.1 (23.1, 84.9)	0.002	120.0 (31.5, 244.1)	0.000	0.091

Tabla 11. Datos basales, 3 meses y 12 meses posteriores al tratamiento para marcadores óseos medidos mediante ELISA multiplex con tecnología LUMINEX MAGPIX®. Cambios cuantitativos de los diferentes marcadores óseos en plasma al nivel basal, 3 y 12 meses después del tratamiento. Se muestran los datos referentes a los paciente tratados con tenofovir, tanto TDF como TAF. Los cambios se describen por porcentaje, mediana y cuartiles (entre paréntesis), utilizando la prueba de clasificación de Wilcoxon. P₁= Basal vs 3 ó 12 meses para cada tratamiento, P₂= comparación de la variación de cada parámetro entre tratamientos (TDF vs TAF).

2.3.3. Cambios en el perfil inflamatorio de los pacientes con VIH tratados con tenofovir (TDF y TAF).

Una vez analizadas las diferentes citoquinas en los pacientes con VIH, se observó que tanto el grupo tratado con TDF como los tratados con TAF, mostraron a los 3 meses de tratamiento un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias con respecto a su estado basal (**Tabla 12**). El aumento fue más acentuado en los pacientes que recibieron tratamiento con TAF. Además, también se produjo un aumento generalizado de las citoquinas anti-inflamatorias a los 3 meses del inicio del tratamiento en el grupo TAF (**Tabla 12**). En el grupo tratado con TDF, en cuanto a las citoquinas anti-inflamatorias, se vio que disminuían con respecto al estado basal de forma generalizada (**Tabla 12**).

A los 12 meses de tratamiento, seguimos viendo que tanto en el grupo TDF como TAF, las citoquinas pro-inflamatorias experimentaron un incremento significativo con respecto a los niveles basales (**Tabla 12**). En el caso de las citoquinas anti-inflamatorias el perfil fue muy variable; unas se redujeron con respecto al basal en ambos grupos de tratamiento [IL-10, IL-4 y IL-5 (en el caso de TDF)] y otras experimentaron un incremento al cabo de los 12 meses de tratamiento [IL-13 y IL-5 (en el caso de TAF)] (**Tabla 12**).

Evolución	Variable	TDF		TAF		p_2
		Mediana (Q1, Q3)	p_1	Mediana (Q1, Q3)	p_1	
Basal-3 m	GMCSF	-2.4 (-16.5, 42.9)	0.551	11.6 (2.3, 41.7)	0.080	0.391
	IFNg	-1.1 (-13.1, 26.7)	0.640	19.5 (-7.7, 56.3)	0.104	0.258
	IL10	-5.8 (-30.5, 14.8)	0.865	39.6 (-11.2, 98.3)	0.038	0.171
	IL12	0.5 (-7.0, 65.1)	0.263	21.8 (-3.9, 51.3)	0.060	0.594
	IL13	-21.1 (-60.9, 51.2)	0.799	32.5 (-38.1, 105.3)	0.145	0.219
	IL1b	2.2 (-14.3, 57.7)	0.325	17.3 (-20.7, 77.3)	0.196	0.963
	IL2	-11.8 (-17.8, 30.6)	0.865	21.8 (2.3, 73.6)	0.040	0.070
	IL4	-9.1 (-16.0, 10.7)	0.570	5.0 (-16.3, 60.1)	0.210	0.358
	IL5	1.7 (-15.6, 84.9)	0.325	20.1 (-29.0, 58.4)	0.252	0.986
	IL6	8.5 (-17.1, 40.4)	0.246	46.7 (-10.9, 390.3)	0.051	0.207
	IL7	-1.3 (-4.4, 12.0)	0.304	23.1 (3.9, 40.1)	0.023	0.081
	IL8	10.8 (-36.4, 63.3)	0.304	22.5 (-58.8, 84.3)	0.495	0.988
	TNFa	1.8 (-22.9, 23.8)	0.702	36.6 (9.1, 109.8)	0.007	0.034
	Basal-12 m	GMCSF	-35.1 (-57.7, -25.4)	0.001	7.5 (-28.3, 42.7)	0.490
IFNg		19.2 (-39.2, 69.6)	0.358	30.5 (-10.4, 62.4)	0.055	0.627
IL10		-20.3 (-56.2, 15.0)	0.153	-7.0 (-39.4, 90.3)	0.468	0.180
IL12		-4.0 (-44.8, 33.7)	0.305	-15.1 (-43.4, 34.4)	0.651	0.734
IL13		13.6 (-61.6, 81.3)	0.542	32.6 (-35.9, 112.2)	0.120	0.316
IL1b		-1.9 (-39.2, 17.1)	0.946	28.9 (-32.9, 64.0)	0.170	0.395
IL2		33.6 (-6.2, 113.4)	0.042	62.1 (6.9, 106.6)	0.002	0.553
IL4		-35.7 (-62.9, -3.4)	0.005	-59.4 (-74.2, -46.9)	0.008	0.255
IL5		-17.2 (-53.3, 35.6)	0.855	78.4 (-31.5, 160.7)	0.027	0.084
IL6		55.3 (-2.9, 213.6)	0.030	129.9 (4.0, 222.1)	0.005	0.837
IL7		56.2 (-7.0, 192.9)	0.035	-26.4 (-41.0, 12.7)	0.156	0.010
IL8		41.0 (-1.5, 152.5)	0.078	108.5 (45.4, 207.3)	0.000	0.179
TNFa		-5.6 (-23.1, 33.6)	0.893	44.8 (3.2, 81.3)	0.007	0.075

Tabla 12. Datos basales, 3 meses y 12 meses posteriores al tratamiento para los niveles plasmáticos de citoquinas pro y antiinflamatorias, medidas mediante ELISA multiplex con tecnología LUMINEX MAGPIX®. Cambios cuantitativos de las diferentes citoquinas pro y anti-inflamatorias medias en plasma a nivel basal, 3 y 12 meses después del tratamiento. Se muestran los datos referentes a los paciente tratados con tenofovir, tanto TDF como TAF. Los cambios se describen por porcentaje, mediana y cuartiles (entre paréntesis), utilizando la prueba de clasificación de Wilcoxon. P_1 = Basal vs 3 ó 12 meses para cada tratamiento, P_2 = comparación de la variación de cada parámetro entre tratamientos (TDF vs TAF).

DISCUSIÓN

1. Impacto de la manipulación quiropráctica en la prevención de la artrosis en un modelo animal de conejo.

El trabajo descrito en la presente tesis doctoral y los resultados obtenidos, han permitido evidenciar el por qué la MQ podría ser una alternativa eficaz para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas como la OA. Se ha caracterizado el efecto de esta terapia manipulativa en el remodelado óseo a través del sistema RANKL/OPG y la evaluación de marcadores de remodelado como TRAP y FA. A su vez, se ha demostrado la asociación existente entre el remodelado óseo y la homeostasis del metabolismo del cartílago valorando el daño histológico presente en las articulaciones de los conejos artrósicos que recibieron MQ y los que no la recibieron. Por otro lado, en ambos grupos de animales, se han analizado los cambios histológicos de la membrana sinovial desencadenados por cambios en la estructura de la matriz extracelular (MMP-3, COLVI, CD31 y VEGF), la liberación de mediadores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , COX-2) e infiltrado celular (RAM-11). Finalmente, y de modo muy preliminar, se ha estudiado en sinovial la expresión de neurotrofinas importantes en la regulación de la inervación de tejidos dañados (Sema 3A y Netrina-1), relacionándola con una posible acción moduladora del dolor por parte de la MQ.

A continuación, se analizan los principales resultados obtenidos de cada uno de los tejidos descritos en este trabajo de tesis.

1.1. La MQ con ActivatorV® modula el remodelado del hueso cortical subcondral y hueso trabecular subcondral en la tibia de los conejos artrósicos.

Asociada a la OA, se ha descrito que la pérdida de movilidad y función de las extremidades conlleva a una desmineralización del hueso [155] y sarcopenia [156]. El menor contenido mineral óseo observado en este modelo, junto con la posible menor masa muscular pudieran estar contribuyendo a la pérdida de peso que se observó en los animales artrósicos con respecto a los sanos en el estudio [155, 156]. Además, la propia cirugía para producir la enfermedad pudiera estar incidiendo también en esta pérdida de peso [157].

En cuanto a la desmineralización ósea, característica de este modelo, se ha descrito que la mayor pérdida de DMO tibial en la OA se produce principalmente en las placas tibiales internas [158, 159]. Esto parece ser debido al mal alineamiento estático de la rodilla y la sobrecarga dinámica articular que se produce en la OA, distribuyéndose la carga

principalmente sobre la región interna y repartiéndose progresivamente hacia la zona lateral externa [158, 159]. Curiosamente, a pesar de que las placas tibiales externas, fueron las regiones articulares más próximas al lugar donde se aplicó la MQ, toda la placa tibial se vio afectada por las ondas de choque inducidas por el ActivatorV®. Esto pudiera estar relacionado con el grado de expansión de la onda de choque por el espacio tridimensional, a través de las diferencias de presiones y la cavitación generadas [57, 160].

La mejoría en los parámetros de masa ósea observada tras la MQ en este modelo, han sido descritos anteriormente por López-Herradón y colaboradores en un modelo de osteoporosis en rata [77]. Resultados similares han sido expuestos por Shi y colaboradores al analizar el efecto de la EWST en pacientes osteoporóticas postmenopáusicas que sufrían OP lumbar y femoral [161]. Estos autores sostienen la hipótesis de que el estímulo con ondas de choque podría estar induciendo la expresión y secreción de factores de crecimiento, que potenciarían la actividad de los osteoblastos y se estaría inhibiendo la diferenciación de los osteoclastos y su efecto resortivo en el hueso [161]. En consonancia con lo descrito anteriormente, en este modelo de OA se observó una reducción en la expresión de marcadores de diferenciación de osteoclastos y su actividad tras la MQ. Así, el ratio RANKL/OPG tanto en el hueso subcondral como en el cartílago fue mayor en las muestras de los animales que recibieron falsa MQ, que los encontrados en los conejos que recibieron la verdadera manipulación. En este sentido, varios trabajos previos han sugerido que los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento en la OA, podrían participar en la diferenciación de precursores de osteoclastos debido a que expresan RANKL en mayor medida que OPG modificando su equilibrio a favor de la osteoclastogénesis [32, 37]. Esta circunstancia remarcaría el poder modulador del impacto mecánico inducido por el ActivatorV® en el remodelado óseo, a través del control de la actividad de osteoclastos y osteoblastos, y refuerza la idea del sistema RANKL/OPG como una diana terapéutica importante a tener en cuenta en la enfermedad de OA [32, 37]. El resultado de la tinción TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato, sintetizada por osteoclastos) apoya la idea de la mayor activación osteoclástica presente en los huesos artrósicos con falsa MQ y la reversión (parcial) de la resorción ósea con la MQ.

Por otro lado, los resultados obtenidos tras estudiar la actividad osteoblastogénica mediante la expresión de la fosfatasa alcalina (FA), siguen la tendencia descrita anteriormente, apoyando la hipótesis de la modulación del remodelado óseo por parte de la MQ. Así, con la MQ se consigue revertir parcialmente el daño producido en el hueso subcondral por la acción resortiva de los osteoclastos. Esta mejora tisular, se refleja en una

menor activación de los osteoblastos, debido a que la matriz ósea se encuentra menos deteriorada y no se produce el efecto anabólico compensador [36] visto en las tibias de los conejos que no recibieron la MQ.

En cuanto a la microarquitectura del hueso subcondral se observó una clara diferencia en las tibias que recibieron verdadera MQ: un aumento en el número de trabéculas, con la consiguiente reducción de espacio entre ellas, en comparación con las tibias que recibieron falsa MQ, cuyo número se encontraba disminuido respecto a los animales sanos. Resultados similares fueron descritos por López-Herradón y colaboradores en el estudio del hueso trabecular femoral en ratas osteoporóticas manipuladas con ActivatorV® [77]. Curiosamente, a diferencia de lo visto en el citado trabajo, en el modelo de OA se observó que el grosor de las trabéculas en las tibias del grupo que recibió verdadera MQ fue menor que el encontrado en los animales con falsa manipulación. El hecho de no encontrar diferencias en el grosor trabecular en el modelo de rata, podría explicarse en base a lo que Longo y colaboradores describieron recientemente [162]. De todos los parámetros medidos por microCT, el grosor trabecular es un parámetro que tiende a sobreestimarse cuando se analiza, debido al propio algoritmo e interpretación digital en 3D que realiza el software [162], dando lugar a variaciones entre el grosor real y el digitalizado. Además, con un tamaño de vóxel de medida más grande (como sería en nuestro caso), se dificulta la identificación de los límites trabeculares y la medida de su grosor, ya que las imágenes se pixelan y la superficie se expande un poco (más cuanto menor es el tamaño de la muestra analizada), lo que resulta en una medida imprecisa del grosor de la superficie binarizada [163, 164]. Por otro lado, las diferencias anatómicas entre la tibia de conejo y la de rata, es otro factor a tener en cuenta en la resolución del análisis por microCT del hueso trabecular [165], y que habría que considerar a la hora de interpretar las diferencias observadas en el grosor trabecular entre los dos modelos.

Resultados obtenidos en trabajos sobre OA y el ESWT, apoyan la idea de que esta terapia es capaz de modular y reducir los efectos catabólicos desencadenados por los osteoclastos en la resorción ósea, tanto en hueso trabecular subcondral como cortical subcondral, lo que conlleva a una mejora de las propiedades biomecánicas del hueso [166-169]. Esto podría explicar los efectos observados en este modelo animal. Como se vio para el hueso subcondral cortical, en el hueso subcondral trabecular, el estímulo mecánico con ActivatorV® estaría modulando y reduciendo el efecto resorptivo de los osteoclastos, lo que se traduciría en un mayor número de trabéculas pero que podrían presentar propiedades mecánicas más limitadas.

1.2. El estímulo mecánico aplicado con ActivatorV® reduce las lesiones en el cartílago generadas durante la artrosis.

Está ampliamente descrito en la bibliografía el efecto producido por la escisión del ligamento cruzado anterior en la degeneración del cartílago, resultando en un aumento directo del estrés por contacto tibia-femoral [170]. Se ha demostrado que la escisión del ligamento cruzado anterior, la menisectomía y la sobrecarga repetida a largo plazo inducen la degeneración del cartílago a lo largo del tiempo en términos de fisuras superficiales, hipocelularidad, pérdida de integridad estructural, disminución de proteoglicanos y pérdida de consistencia general del tejido [170-176]. La fisuración y la pérdida de proteoglicanos tienden a empeorar con el tiempo [177-180], manteniéndose el grado degenerativo de forma homogénea en toda la superficie tisular del cartílago articular [181, 182]. Por otro lado, la proximidad entre hueso y cartílago en la rodilla, proporciona un tránsito de proteínas y moléculas reguladoras entre ambos tejidos que condicionan el desarrollo y agravamiento de ambos tejidos en la OA [183]. En esta línea, datos científicos han demostrado que el sistema RANKL/OPG está íntimamente regulado por condrocitos y células óseas, modificando el recambio óseo en pacientes con OA [183]. De hecho, la mejora del hueso subcondral mediante la administración de agentes anti-resortivos como el alendronato o los bifosfonatos ha demostrado prevenir la progresión del daño del cartílago en la OA [177]. Es por ello que, como se describió en el apartado anterior, el ratio RANKL/OPG podría ser la clave en el efecto anti-resortivo de la MQ, modulando la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos; y regulando de este modo el daño producido, tanto en hueso como también en cartílago a través de la diferenciación condrocitaria.

Los datos extraídos del presente trabajo, proporcionan una evidencia histopatológica clara de daño en cartílago causado por la enfermedad. Esta afectación se observó tanto a nivel macroscópico en fémur, en forma de erosiones y pérdida de propiedades del cartílago, como a nivel microscópico en las tibias; y fue más severa en las tibias que recibieron falsa MQ. Con la MQ se observó una considerable mejoría en los parámetros analizados. Esta mejora en el cartílago se asoció un menor daño a nivel del hueso subcondral subyacente, lo que corroboraría la importante conexión molecular y fisiológica entre ambos tejidos [183].

En línea con los resultados obtenidos, un elegante trabajo publicado recientemente por Wang y colaboradores [184] demostró que la ESWT aplicada en la articulación de ratas con OA provocada por disección del ligamento cruzado anterior, mejoró el daño del hueso subcondral en tibia. Además comprobaron el efecto condroprotector de las ondas de choque

en la articulación manipulada; algo ya descrito con anterioridad en otros trabajos [49, 50, 52, 185]. Se destaca también en el trabajo, que la acción condroprotectora y los efectos descritos parecen ser sensibles a la ubicación del tratamiento, algo que también se ha visto en este modelo al estudiar el daño en el cartílago de tibias y fémures, y los datos obtenidos del estudio óseo en tibias.

El mecanismo exacto por el que la terapia con ondas de choque produce sus efectos sigue sin tener una explicación clara. Estudios previos han demostrado que estos efectos podrían deberse a cambios en la mecanotransducción que pudieran producir respuestas biológicas en los tejidos diana mediante la anti-inflamación, la promoción de la proliferación celular y la estimulación de la neovascularización, mejorando la regeneración y reparación tisular [186-188].

1.3. Regulación de la sinovitis y la inflamación a través del estímulo mecánico producido por la MQ.

La proliferación de fibroblastos en la matriz sinovial, la destrucción de la arquitectura de la íntima y la infiltración celular de linfocitos y macrófagos son eventos clave en la OA inflamatoria [189]. Estos procesos fueron analizados en este estudio, evidenciándose la sinovitis provocada por la OA en los animales. Todos los parámetros sinoviales histológicos se evaluaron en base a la puntuación histopatológica del *Krenn Score* empleado para la valoración de la sinovitis [135].

La MQ produjo una reducción tanto de la desorganización arquitectónica tisular de la sinovial, como de la fibrotización del estroma y el infiltrado inflamatorio. Dada la significativa diferencia en cuanto al infiltrado inflamatorio observado en los cortes histológicos, se estudiaron tres marcadores pro-inflamatorios clásicos: IL1- β , TNF- α y COX-2 [146, 190]. Cuando se estudió la expresión de IL1- β y TNF- α , ambos marcadores aumentaron considerablemente en la membrana sinovial de los conejos artrósicos, especialmente en el grupo que no recibió MQ. El grupo OAVM presentó niveles de expresión más bajos para IL1- β y TNF- α . Este hecho se corresponde con el menor deterioro sinovial observado en el estudio histológico de la membrana sinovial con puntuación de Krenn. Del mismo modo, la expresión de COX-2 siguió el mismo patrón descrito para IL1- β y TNF- α . Esta observación sugiere que, como se describe en la bibliografía, el tejido lesionado sirve como fuente de mediadores

inflamatorios [190, 191], y la MQ sería capaz de modular y disminuir la expresión de estos marcadores pro-inflamatorios.

En este sentido, estudios realizados previamente por Teodorczyk-Injeyan y colaboradores [192] y Roy y colaboradores [193] demostraron que la MQ de columna vertebral fue capaz de modular y reducir la expresión de marcadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β [192] e IL-6 y proteína C reactiva [193] en pacientes con lumbalgia. Los investigadores explicaron esta mejora de la inflamación en base a un mecanismo anti-inflamatorio central causado por la mejora ortopédica y anatómica de los pinzamientos e impedancias en la conducción nerviosa a través de la medula espinal [194-197]. Esta mejora fisiología y anatómica a nivel óseo y el consecuente efecto reductor de la inflamación local en la articulación, es lo que pudiera estar ocurriendo en el modelo de OA aquí estudiado al aplicar la MQ.

Por otro lado, se ha descrito y se conoce la estrecha relación entre la OA, la inflamación y la angiogénesis [198]. Estudios en pacientes han demostrado un aumento de la vascularización en las membranas sinoviales de enfermos con OA [199]. Tanto la proliferación de nuevos vasos sanguíneos como la inflamación tisular desarrollada por la enfermedad contribuyen a la liberación de mediadores inflamatorios circulantes. Estudios realizados en modelos animales de OA sostienen la posibilidad de que las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α principalmente) puedan estimular la producción de COX-2 y la infiltración de macrófagos en los tejidos inflamados [200-202]. Además, datos publicados en la literatura sostienen que, los macrófagos activados promueven la angiogénesis por la producción de factores angiogénicos que incluyen, citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas; promoviendo la adhesión de células endoteliales, la expresión de receptores y la neo-vascularización [203]. De esta manera, la vascularización del tejido y la infiltración podrían estar regulándose mutuamente, contribuyendo al daño en la sinovial visto en durante el desarrollo de la OA.

En este modelo se estudió la expresión de CD31, un marcador de células endoteliales; y por lo tanto, indicador de vascularización. La expresión de este marcador fue mayor en las membranas sinoviales del grupo OAFM con respecto al grupo OAVM. Además se observó un mayor aumento en la expresión de la proteína VEGF-164 en las membranas sinoviales de los conejos que recibieron falsa MQ en comparación con el grupo OAVM, demostrando así que, el aumento de la inflamación en la membrana sinovial se acompañó de vascularización de *novo*.

Para analizar el infiltrado celular en la sinovial se estudió RAM-11, una proteína característica de macrófagos alveolares de conejo. Como se esperaba, se observó un aumento importante del infiltrado macrofágico en las membranas de las articulaciones que no recibieron MQ.

Por otro lado, para valorar la fibrotización del tejido sinovial, se investigó la expresión de colágeno VI y la activación de metaloproteinasas (concretamente MMP-3). En este sentido, recientes estudios han demostrado, que la expresión de citoquinas como IL1- β y TNF- α producidas por sinoviocitos activados, regulan de manera significativa la expresión de genes de metaloproteinasas [204]. Así, y como era de esperar, la expresión de colágeno VI fue mayor en las sinoviales de los conejos que no recibieron MQ, en comparación con los que sí la recibieron. Resultados similares fueron obtenidos al estudiar la expresión de MMP-3.

Datos en el mismo sentido fueron descritos por Wang y colaboradores; demostrando que la ESWT protegió el cartílago de los daños biomecánicos y previno la esclerosis subcondral a través de la regulación de metaloproteinasas (MMP-1, MMP-3 y TIMP-1) en cartílago y hueso subcondral [169].

En resumen, en vista de los resultados obtenidos, la MQ pudiera estar contribuyendo a la conservación de la estructura de la membrana sinovial a través de la reducción en la expresión de metaloproteinasas, una menor angiogénesis e infiltración inflamatoria ligada a una menor expresión de citoquinas proinflamatorias fruto de la mejora fisiología y anatómica de la articulación.

1.4. Efecto de la MQ en la expresión de Sema 3A y Netrina-1 en membrana sinovial. Potencial implicación en la modulación del dolor en conejos artrósicos.

Recientemente se han descrito una serie de moléculas que juegan un papel importante en la regulación homeostática y neurosensible del tejido óseo y sinovial. Estas moléculas son las semaforinas, proteínas que inicialmente se asociaron al desarrollo del sistema nervioso y la comunicación neuronal [205].

En cuanto a la membrana sinovial, se ha visto que se expresan a nivel endotelial y posee receptores en la superficie de este tejido, sugiriendo un papel en la regulación sensitiva y nociceptiva de la membrana [206]. En este sentido, parece que Sema 3A y sus receptores pudieran desempeñar un importante papel en la regulación de la inervación simpática y

sensitiva aberrante [207]. Su efecto repulsivo axonal, podría proporcionar una nueva perspectiva terapéutica sobre factores moduladores de la inervación anormal de tejidos y del dolor. En esta línea, Hayashi y colaboradores demostraron la acción atenuadora de Sema 3A en cuanto a la transmisión del dolor neuropático en ratas con constricción del nervio ciático [208].

En el mismo sentido, datos recientes han demostrado el papel quimiorrepulsivo de Netrina-1 en la inervación en ratas a las cuales se les indujo alodinia mecánica. El aumento de la expresión de Netrina-1 mediante la activación de sus receptores produjo una reducción de las aferencias primarias y la modulación de la alodinia mecánica y dolor neuropático [209, 210].

En este modelo se observó que, sorprendentemente, tanto la expresión proteica de Sema 3A (que no la génica, debido a un mecanismo de retroalimentación negativa de estimulación transcripcional y síntesis proteica) como de Netrina-1, se vieron aumentadas significativamente en el grupo OAFM con respecto al grupo que recibió la verdadera MQ, siendo mayor la expresión en los conejos artrósicos con respecto a los sanos.

Novedosos estudios científicos han demostrado que la expresión de Sema 3A inhibe la sobreexpresión de MMPs inducida por VEGF en cartílago y tejidos degenerados durante la OA [211, 212]. Tanto Sema 3A como VEGF comparten el mismo receptor (plexina), y parece que ambos compiten a la hora de unirse al receptor y más específicamente en cuanto a su unión a neurofilina-1, co-receptor de plexina [213]. Por otro lado, Tu y colaboradores demostraron recientemente que Netrina-1 es esencial y necesaria para la activación de células endoteliales durante la angiogénesis, así como la transducción de señales para la activación de VEGF y la regeneración tisular [214]. En este mismo sentido, Wilson y colaboradores demostraron que la estimulación con Netrina-1 de ratones con isquemia y vasculopatía produjo un aumento de la neovascularización [215]. Es por estos motivos entre otros que, a nivel de células endoteliales y neuronas, existe una estrechísima regulación en cuanto a angiogénesis e innervación de *novo* en tejidos dañados. Además, está descrito que la señalización de VEGF parece estar asociada directamente con la hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales, reduciéndose la sensibilidad al dolor al desaparecer la señalización de VEGF [216, 217].

Por lo tanto, con los datos extraídos se podría pensar que la MQ podría modular el dolor, no tanto por la evitación de la expansión de fibras sensitivas, como se ha sugerido en estudios sobre las ondas de choque extracorpóreas [188], sino por la reducción de la excitabilidad de las mismas, dada su influencia en la expresión de VEGF (como se discute en el

apartado 1.3). No obstante, y aunque atractivos, estos datos no dejan de ser datos preliminares que requieren de un estudio más exhaustivo.

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo. Estudio de la activación del receptor A_{2A} de adenosina como aproximación terapéutica en pacientes con VIH tratados con tenofovir.

Con este estudio ponemos de manifiesto cómo tenofovir, un análogo nucleotídico que inhibe el enzima transcriptasa reversa del virus del VIH, produce un efecto directo deletéreo en hueso independiente de la infección viral. Comprobamos el efecto de tenofovir en la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos (tanto de origen murino como en líneas celulares). Además demostramos que tenofovir inhibe la salida de ATP mediada por panexina-1/conexina-43 y caracterizaremos las rutas intracelulares involucradas en la pérdida ósea, a través de la ruta de MAPKs y NF κ B. Además, caracterizamos la aplicación terapéutica de dipiridamol, en cuanto a la protección frente a OP causada por tenofovir en modelos animales. Finalmente, describimos el perfil deletéreo óseo en pacientes con VIH *naïve* en las primeras 48 semanas post-tratamiento midiendo marcadores de resorción ósea y citoquinas en suero.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en cada estudio realizado.

2.1. Tenofovir es capaz de modular la diferenciación y función de los osteoclastos *in vitro*, viéndose revertido su efecto por el tratamiento con dipiridamol.

Tenofovir se internaliza en las células y en el interior celular es convertido por quinasas en polifosfatos de tenofovir, mediando los efectos antivirales del fármaco [218]. En relación con el modo de acción de tenofovir en la célula, Velasquez y colaboradores demostraron que, aunque tenofovir en sí mismo es un análogo estructural de AMP; realmente no interfiere con la actividad de la enzima ecto-5' nucleotidasa, crítica para la producción extracelular de adenosina [106]. En el citado trabajo, se demostró que el virus VIH se une al receptor de linfocitos T CD4+ y a los co-receptores CXCR4/CCR5 induciendo la apertura del receptor panexina-1 y produciendo la liberación de ATP. Este ATP extracelular liberado se une y activa

sus receptores purinérgicos P_2X_1 causando la entrada de calcio, y facilitando la entrada del virus y sus posteriores etapas de replicación [106]. Además, observaron que tenofovir era capaz de bloquear panexina-1 y con ello el transporte extracelular de ATP, inhibiendo de esta manera la entrada del virus a la célula y su posterior replicación. En el mismo sentido, recientemente Feig y colaboradores demostraron y confirmaron que la inhibición del transportador panexina-1 por tenofovir, disminuye los niveles extracelulares de ATP, y por consiguiente de adenosina, previniendo la fibrosis generada en modelos murinos cutáneos y hepáticos [108].

En nuestros estudios *in vitro*, demostramos el efecto que tiene tenofovir en la diferenciación y función de los osteoclastos a través de la regulación por ATP y adenosina. Observamos que cuando las células se trataron con tenofovir, se produjo la potenciación en dosis dependiente de la diferenciación de los osteoclastos tanto de línea celular (RAW264.7) como de cultivo primario murino, así como un aumento de la expresión de marcadores de diferenciación osteoclastogénicos como catepsina K y RANKL. Además, observamos que el tratamiento con dipiridamol revirtió el efecto, bloqueando la entrada de adenosina a través de los transportadores ENT 1/2, y permitiendo un aumento de la concentración extracelular de adenosina y la activación de sus receptores, en particular $A_{2A}R$, receptor importante para la inhibición de la osteoclastogénesis como se comprobó en trabajos anteriores [118, 128]. Este hecho se confirmó mediante los experimentos llevados a cabo en línea celular RAW264.7, en los que se estudió la acción de los transportadores panexina-1, conexina-43 y el receptor A_{2A} de adenosina en la diferenciación y función de los osteoclastos. En ausencia de panexina-1 y conexina-43 el tratamiento con tenofovir no fue capaz de inducir un incremento en la diferenciación de los osteoclastos, y además tampoco incrementó la resorción en los discos de dentina en comparación con el control. Por el contrario, cuando se silenció el receptor A_{2A} , tenofovir fue capaz de inducir ese incremento en la resorción y se apreciaron más fosas de erosión en los discos. Por su parte, dipiridamol consiguió revertir el efecto de tenofovir sobre la formación de fosas en las células RAW264.7 control y en las silenciadas para panexina-1 y conexina-43 estaban silenciadas, pero no en las silenciadas para $A_{2A}R$. Demostrándose de este modo la importante acción directa de tenofovir sobre el transporte del ATP y la diferenciación y función de los osteoclastos; y por otro lado, el efecto de reversión de dipiridamol, modulando la diferenciación y función osteoclastogénica a través del $A_{2A}R$ de adenosina.

Pese a los diversos estudios que se han realizado del efecto de tenofovir en el metabolismo óseo, a nivel *in vitro*, este trabajo es uno de los primeros estudios en abordar el mecanismo de acción involucrado en el efecto de tenofovir en la diferenciación de los

osteoclastos y osteoblastos. Anteriormente, Grigsby y colaboradores [219] describieron cómo la exposición de los osteoclastos primarios a TDF resultó en una des-regulación de tres genes (Snord32a, Gnas y Got2) que conducía a la disfunción celular. Uno de los genes estudiados por Grigsby y colaboradores [219] Gnas (proteína de unión a nucleótidos de guanina [GalphaS]), activa las rutas dependientes de AMPc por estímulo de su producción a partir de ATP y posterior activación de los receptores de adenosina, concretamente el A_{2A}R. De acuerdo con el estudio llevado a cabo por los investigadores mencionados, esta regulación negativa del gen daría lugar a una regulación negativa de la señalización por MAPK/ERK y reducción de la diferenciación de osteoclastos.

En esta tesis doctoral, los resultados obtenidos indican que, tenofovir activa las vías de señalización involucradas en la promoción de la diferenciación de los osteoclastos incluyendo la activación de vías MAPK y la translocación al núcleo de NFκB. Se observó que tras pre-tratar las células con dipiridamol, para incrementar los niveles extracelulares de adenosina previos al tratamiento con tenofovir, se produjo una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y p38 inducidas por tenofovir, así como un incremento en la translocación al núcleo de NFκB. Estos resultados se correlacionan con lo demostrado previamente por Mediero y colaboradores, quienes describieron que la activación directa del A_{2A}R inhibe la translocación al núcleo de NFκB y la diferenciación de los osteoclastos por un mecanismo que involucra la señalización por la ruta cAMP-PKA-ERK1/2 [122], reflejándose lo que describieron anteriormente Grigsby y colaboradores [219].

2.2. Tenofovir es capaz de modular la diferenciación y función de los osteoblastos *in vitro*, viéndose revertido su efecto por el tratamiento con dipiridamol.

Así mismo, la actividad de formación de hueso por los osteoblastos, también se podría ver reducida por el tratamiento con tenofovir, produciéndose una pérdida general de densidad mineral ósea. Está bien descrito que en pacientes con VIH, los osteoblastos no llegan a infectarse por el virus [220]. La proteína viral gp120, que forma parte de la envoltura del virus, induce la secreción de RANKL y estimula la proliferación de los osteoblastos, protegiendo estas células de la apoptosis [220]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que tenofovir tiene un efecto supresor sobre la mineralización primaria de osteoblastos humanos, afectando a los transportadores de fosfato dependientes de sodio tipo II y tipo III [221]. Así mismo, un

estudio realizado en ratas transgénicas para VIH demostró que el daño óseo producido por la infección se debía a una menor expresión de OPG por las células B, dando como resultado un aumento de la relación RANKL/OPG y, por lo tanto, de la osteoclastogénesis y pérdida ósea [222]. Este mecanismo de pérdida de hueso inducida por la disfunción de células B inducida por el VIH se confirmó posteriormente en un estudio clínico de individuos infectados por el VIH no tratados [99]. En el mismo sentido de los trabajos previamente descritos, nuestros datos demuestran la modulación del remodelado óseo por tenofovir, produciéndose un incremento de RANKL y disminución de OPG en los ratones que se trataron con el fármaco.

Además, demostramos que tenofovir disminuyó la diferenciación y función de los osteoblastos murinos en dosis dependiente mediante un mecanismo relacionado con la señalización a través de β -catenina. Este efecto se observó *in vitro*, por un lado con la disminución de la diferenciación osteoblástica y reducción de los depósitos de calcio celulares (experimentos con tinción de rojo de alizarina) y por otro lado con la inhibición de la expresión de β -catenina y su translocación al núcleo. Además, pudimos demostrar la reversión del efecto de tenofovir sobre los osteoblastos tratando con dipiridamol. Esto podría suponer un mecanismo novedoso que contribuyese a la alteración de la homeostasis ósea, relacionando la regulación a través de la vía de β -catenina y el $A_{2A}R$ como ya se ha demostrado anteriormente en fibroblastos, implicando a ambos en fibrosis y cicatrización [223]. Así mismo, los resultados nos indican que la función de los osteoblastos se vio alterada en presencia de tenofovir.

2.3. Efectos de tenofovir *in vivo* en ratones sanos y osteoporóticos, tanto *wild type* como deficientes del $A_{2A}R$.

Estudios previos realizados en ratas demuestran que una exposición relativamente corta a estavudina (inhibidor de la transcriptasa inversa análogo a nucleósido), tanto por sí sólo como conjugado con tenofovir, disminuyó significativamente la DMO en los fémures estudiados [224]. Este hallazgo se reproduce en nuestros modelos animales de ratón *wild type* macho, demostrando que, incluso en ausencia de infección por VIH, tenofovir es capaz de disminuir la DMO, el CMO y alterar la micro-arquitectura del hueso trabecular potenciando la acción resortiva ósea. El daño en el hueso cortical y trabecular se potenció en el modelo de OP generado en las ratonas ovariectomizadas, viéndose reducción tanto de DMO como CMO y de los parámetros trabeculares (BV/TV, Tb N, Tb Th y Tb Sp). Así mismo, Conradie y colaboradores [224] también observaron que el tratamiento con estavudina y tenofovir dio lugar a un

aumento del tejido adiposo medular y una disminución en el número de osteoblastos. En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente resultados [112] que se corresponden con lo descrito previamente por Conradie y colaboradores. Se observó por estudios histomorfométricos llevados a cabo en cortes en congelado de fémures de ratones macho WT, que el tratamiento con tenofovir produjo una disminución tanto del contenido mineral óseo (BV/TV y TV) como del número de osteoblastos por área analizada [112]. De hecho, encontramos un incremento en el número de osteoclastos por área de análisis [112]. En cambio, al tratar con dipiridamol se consiguió revertir el perfil osteoclastogénico, aumentado significativamente el número de osteoblastos y los parámetros de remodelado óseo BV/TV y TV [112].

Por inmunofluorescencia se comprobó que los parámetros de resorción ósea (catepsina K, RANKL y TRAP) estaban aumentados en los ratones tratados con tenofovir y que había un mayor remodelado óseo (OPG y FA se mantuvieron bajos con el tratamiento con tenofovir) describiéndose los efectos visto a nivel estructural por microCT e histomorfometría. Por su parte, dipiridamol revirtió este perfil resorptivo óseo, mejorando la micro-arquitectura ósea y la expresión de marcadores anabólicos.

En el caso de los ratones silenciados para el gen del $A_{2A}R$, como cabría esperar, dipiridamol no ejerció el efecto de reversión que se vio en el modelo *wild type*, no viéndose cambios significativos en los parámetros de microCT y tampoco en la histología entre los diferentes tratamientos. Aunque dipiridamol incrementa la concentración de adenosina extracelular, al no disponer del $A_{2A}R$, no estamos activando las rutas inhibitorias de osteoclastogénesis promovidas por este receptor y por tanto no podemos revertir la acción de tenofovir. Trabajos llevados a cabo por Mediero e Ishack y colaboradores [123, 127-129] demostraron el importante papel regulatorio de la regeneración ósea que tiene $A_{2A}R$, demostrando cómo la ausencia del receptor no permitía la estimulación de la diferenciación de los osteoblastos y la regeneración ósea de lesiones provocadas debido al daño crítico realizado con el punzón en la calvaria de ratón [120, 127-129]. En estos ratones con defecto crítico óseo y tratados con implantes embebidos en dipiridamol, se observó un aumento de la diferenciación de los osteoblastos, reflejándose en una mayor regeneración de las lesiones inducidas en los ratones; no viéndose tal efecto en ausencia de $A_{2A}R$ como describimos previamente. Adicionalmente, interesantes estudios recientes de regeneración ósea llevados a cabo en modelos murinos de calvaria y también en modelos de erosión mandibular en conejo, han puesto de manifiesto la importante acción de dipiridamol en la estimulación de la síntesis de matriz ósea a través de la activación de $A_{2A}R$ [130, 131]. Con estos trabajos, se pone de

manifiesto el potencial terapéutico de la activación directa e indirecta de A_{2A}R como terapia frente al daño óseo provocado por tenofovir.

Por último, en nuestro modelo *in vivo*, no hemos visto signos de hipofosfatemia u osteomalacia (**Fig. 49**). En línea con esto, en la bibliografía podemos encontrar trabajos que demuestran que en los pacientes con VIH tratados con tenofovir es habitual encontrar hipofosfatemia vinculada a una reabsorción tubular disminuida, que pudiese derivar en daño renal ocasionado por el tratamiento [225]. No obstante, en controversia con lo anterior, un estudio observacional prospectivo realizado en diferentes individuos con VIH tratados con y sin tenofovir, demostró que la etiología de la hipofosfatemia parece ser multifactorial y no está relacionada directamente con tenofovir o la disfunción renal [226]. En relación con la osteomalacia, Mateo y colaboradores demostraron en un estudio con 5 pacientes, que tras el tratamiento con tenofovir durante más de 5 años, estos individuos desarrollaron osteomalacia hipofosfatémica [154]. Estos datos nos indican y ayudan a entender los resultados que obtenemos en nuestro trabajo. La hipofosfatemia y la osteomalacia relacionada con la terapia antirretroviral, se genera a largo plazo; por lo que nuestro modelo animal que se trató durante 4-5 semanas no reproduce los efectos presentados en cuanto al metabolismo del fósforo durante terapias antirretrovirales de larga duración. Se estarían mimetizando las etapas previas donde estos cambios aún no han llegado a producirse.

2.4. La terapia antirretroviral de primera línea con tenofovir induce un estado catabólico óseo derivando en osteopenia y osteoporosis en pacientes con VIH.

Las guías nacionales e internacionales para el tratamiento inicial de pacientes infectados con VIH [86-88] recomiendan el uso de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIN) más un tercer fármaco activo: un inhibidor de la transferencia de la cadena de integrasa (INSTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a nucleósido (ITINN), o un inhibidor de la proteasa (IP). Entre los ITIN, tenofovir disoproxil fumarato (TDF) fue aprobado por las autoridades reguladoras de medicamentos estadounidenses y europeas y estuvo disponible para el tratamiento del VIH en 2002. Desde su aprobación, este medicamento se ha incluido en la mayoría de los regímenes recomendados y ha sido el ITIN más utilizado durante muchos años basado en su alta eficacia establecida y, en general, buena tolerancia, como se demostró en ensayos clínicos y estudios de vida media del fármaco [89-93].

Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) fue aprobado para el tratamiento de la infección por VIH en combinaciones de terapia antirretroviral en octubre de 2001. Se usa ampliamente en el tratamiento de primera línea de la infección por VIH y actualmente también está indicado para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B. TDF es un inhibidor de la transcripción inversa análogo de AMP. Pertenece a la misma clase de medicamentos que adefovir y cidofovir, que tienen efectos nefrotóxicos en los túbulos proximales. Aunque el TDF es mucho menos nefrotóxico, en los últimos años ha surgido una creciente evidencia que asocia su uso con el desarrollo de disfunción tubular proximal del riñón, síndrome de Fanconi e insuficiencia renal [94, 95]. En 2015 se aprobó por primera vez tenofovir alafenamida fumarato (TAF), un nuevo profármaco oral de tenofovir, que junto con emtricitabina, elvitegravir y cobicistat (EVG/c/FTC/TAF) forman una terapia antirretroviral de primera línea. La terapia que contiene TAF tienen menos impacto en las medidas de seguridad renal y ósea en comparación con los tratamientos que contienen TDF; se cree que esto se debe a la reducida dosis farmacológica de tenofovir alafenamida (10-25 mg frente a los 300 mg de TDF), que es suficiente para alcanzar una concentración intracelular óptima del metabolito activo tenofovir-difosfato y, en consecuencia, una reducción significativa en las concentraciones plasmáticas de tenofovir [96-98]. Las guías clínicas sostienen que el uso de los tratamientos antirretrovirales que contienen TAF es preferible a los que contienen TDF, debido a la mayor eficacia y al mejor perfil de tolerancia demostrado en pacientes de ensayos clínicos [86-88]. En un ensayo exploratorio de fase 3 en 153 adultos sin tratamiento previo, el régimen de darunavir, cobicistat, emtricitabina y tenofovir alafenamida tuvo una eficacia virológica similar a la de un régimen de darunavir y cobicistat combinado con emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato al cabo de 24 semanas de tratamiento (US Food y FDA, punto final primario, con un margen de no inferioridad del 12%), con seguridad renal y ósea significativamente mejorada. Es importante destacar que no hay resistencia a ninguna de los compuestos en estudio [227].

En nuestro análisis prospectivo a 48 semanas, los cambios porcentuales observados en los marcadores de formación ósea y reabsorción fueron mayores en pacientes tratados con TDF y TAF que con abacavir (datos nos mostrados por su inclusión en otra tesis doctoral). Además, se encontró que el mayor porcentaje de aumento medio en el plasma CTX y P1NP ocurrió en pacientes tratados con TDF con descensos clínicamente relevantes en la DMO de la cadera y la columna vertebral en la semana 48 con respecto al estado basal. Es interesante observar que en los pacientes que reciben TDF, el curso temporal del cambio en CTX, un marcador catabólico de resorción, en comparación con los marcadores anabólicos de formación, sugiere un estadio en la que la resorción ósea parece superar la formación ósea. En

conjunto, nuestros resultados respaldan el concepto de que la reducción de las exposiciones sistémicas a tenofovir puede ser responsable de los cambios mínimos en la renovación ósea y las menores disminuciones en la DMO observada en pacientes que reciben TAF en comparación con los que reciben TDF.

La mayoría de los estudios y ensayos clínicos que aparecen en la bibliografía se centran en tiempos de terapia más prolongados, desde 96 hasta 144 semanas, por lo que aportamos datos en las etapas iniciales y próximas al año de tratamiento que podrían ayudar a prevenir y mejorar el tratamiento y comorbilidades de la terapia antirretroviral. Además, estudios recientes en pacientes con VIH en edades comprendidas entre 50 y 70 años demuestran que la herramienta de predicción de fracturas FRAX modificado para OP secundaria, infraestimó la incidencia de fractura en más del 90% de los pacientes en estudio [228].

A la vista de estos resultados, nos planteamos la posibilidad de realizar estudios óseos más allá de lo que se sugiere en las guías nacionales y europeas, en etapas iniciales de la enfermedad y con el objetivo de tener constancia de la situación basal ósea de pacientes jóvenes infectados por el virus.

No obstante, el estudio podría tener las siguientes limitaciones: el propio tiempo de terapia estudiado (48 semanas), por lo que se necesitan estudios a más largo plazo para comprender mejor las implicaciones clínicas en la fisiopatología ósea de estos hallazgos. Además, el número de pacientes es más reducido que la media de los estudios clínicos publicados, pues estamos ante un estudio prospectivo inicial llevado a cabo en un único hospital de la Comunidad de Madrid.

CONCLUSIONES

1. Evaluación del estímulo mecánico inducido por la manipulación quiropráctica mediante el dispositivo ActivatorV® en la progresión de la artrosis en conejo.

1. La MQ con ActivatorV® reduce la pérdida de hueso cortical subcondral y hueso trabecular subcondral asociado a la OA. Este efecto se asocia a una reducción del ratio de expresión RANKL/OPG, sugiriendo una acción anti-resortiva de la MQ.
2. La MQ disminuye la pérdida de proteoglicanos y mejora la organización condrocitaria en el cartílago tibial del conejo artrósico; además de regular la expresión de RANKL/OPG en el condrocito hipertrófico, sugiriendo un papel condroprotector de la MQ.
3. Con el estímulo mecánico inducido por la MQ, se reduce el infiltrado celular y la expresión de marcadores de inflamación como COX-2, TNF- α e IL1- β consiguiendo disminuir la angiogénesis y la fibrosis de la membrana sinovial de los animales artrósicos.
4. La MQ pudiera jugar un papel en la modulación de la inervación sensitiva y el dolor a través de la regulación de la expresión de las neurotrofinas Sema 3A y Netrina-1 en la membrana sinovial.
5. La MQ pudiera representar una terapia física alternativa prometedora para el tratamiento de la OA, aunque su contribución concreta a los procesos de reversión de la esclerosis subcondral y sinovitis ha de ser estudiada en profundidad.

2. Evaluación de los efectos deletéreos del fármaco antirretroviral tenofovir en el metabolismo óseo y su reversión por dipiridamol.

1. El tratamiento con tenofovir incrementa de forma directa la formación de osteoclastos activando cascadas de señalización de MAPKs y NF κ B *in vitro* e *in vivo* y este efecto es revertido en presencia de dipiridamol por la activación de A_{2A}R.
2. Tenofovir es capaz de inhibir la diferenciación de los osteoblastos *in vitro*, a través de un mecanismo dependiente de la activación de β -catenina. Igualmente, dipiridamol es capaz de revertir la inhibición y potenciar la diferenciación osteoblástica.

3. El tratamiento con tenofovir induce una pérdida de peso en los animales tratados, así como un descenso en la densidad mineral ósea y deterioro del hueso trabecular en ratones macho y hembra OVX. El efecto es revertido por dipiridamol.
4. La reversión de los efectos deletéreos óseos inducidos por tenofovir con el tratamiento es dependiente de la activación de $A_{2A}R$, ya que lo visto en los ratones *wild type*, no se reproducen en los ratones *knock-out* para $A_{2A}R$.
5. La terapia antirretroviral con tenofovir induce un estado catabólico osteopénico/osteoporótico que se inicia en etapas tempranas tras el tratamiento. Por lo tanto, una diana interesante para corregir esta osteopenia producida por tenofovir sería la regulación de los receptores de adenosina por dipiridamol.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology* 2014; 53:1-3.
2. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis: three subsets with etiological, clinical and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 2009, 39:71-80.
3. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012, 8:729-37.
4. Sellam J, Herrero-Beaumont G, Berenbaum F. Osteoarthritis: pathogenesis, clinical aspects and diagnosis. In *Eular Compendium on Rheumatic Diseases*. Edited by Bijlsma JWJ, Burmester GR, daSilva JAP, Faarvang KL, Hachulla E, Mariette X. London, UK: BMJ Group; 2009:444-463.
5. Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS.* 2006; 20:2165–74.
6. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:1697–707.
7. Praemer A, Furner S, Rice DP. *Musculoskeletal Conditions in the United States*. American Academy of Orthopaedic Surgeons; Rosemont, IL: 1999.
8. Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011; 25: 815–823.
9. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res.* 2011; 29:802-9.
10. Dijkgraaf LC, Liem RS, de Bont LG. Ultrastructural characteristics of the synovial membrane in osteoarthritic temporomandibular joints. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1269e79.
11. Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone.* 2003; 33:1-13.
12. Richard F, Villars M, Thibaud S. Viscoelastic modeling and quantitative experimental characterization of normal and osteoarthritic human cartilage using indentation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013; 24:41-52.
13. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11:224.

14. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:216.
15. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012; 4:269-285.
16. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, *Ihh*/*Pthlh*, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell.* 2002; 3:439-449.
17. Studer D, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012; 24:118-135.
18. Solomon LA, Bérubé NG, Beier F. Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Brith Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 2008; 84:123-130.
19. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nutall ME, Hung HH, Blake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 381:205–12.
20. Guilak F, Sah RL, Setton LA. Physical regulation of cartilage metabolism. In: Mow VC, Hayes WC, editors. *Basic orthopaedic biomechanics.* 1997 2nd ed. Lippincott-Raven; Philadelphia.
21. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res.* 1988; 6:777–92.
22. Guilak F, Meyer BC, Ratcliffe A, Mow VC. The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994; 2:91–101.
23. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, Lee DA. Dynamic compression counteracts IL-1 β induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:R35.
24. Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Fink C, Guilak F. Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10:792–8.
25. Musumeci G, Loreto C, Leonardi R, Castorina S, Giunta S, Carnazza ML, Trovato FM, Pichler K, Weinberg AM. The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2013; 31:274–284.

26. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Nishida K, Caldwell H, Nuki G, Salter DM. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol.* 1999; 145:183–189.
27. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12: 31–33.
28. Eckstein F, Hudelmaier M, Putz R. The effects of exercise on human articular cartilage. *J Anat.* 2006; 208:491–512.
29. Musumeci G, Trovato FM, Pichler K, Weinberg AM, Loreto C, Castrogiovanni P. Extra-virgin olive oil diet and mild physical activity prevent cartilage degeneration in an osteoarthritis model: An *in vivo* and *in vitro* study on lubricin expression. *J Nutr Biochem.* 2013; 24, 2064–2075.
30. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster J-YL, Henrotin YE. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005; 13:988-997.
31. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol.* 2000; 35:581-588.
32. Martínez-Calatrava MJ, Prieto-Potín I, Roman-Blas JA, Tardio L, Largo R, Herrero-Beaumont G. RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14:R149.
33. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone and osteoarthritis: biological and celular aspects. *Osteoporos Int.* 2012; 23:S847-851.
34. Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Alvarez-Soria MA, Largo R. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:478-488.
35. Chiba K, Uetani M, Kido Y, Ito M, Okazaki N, Taguchi K, Shindo H. Osteoporotic changes of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the knee: a 3-T MRI study. *Osteoporos Int.* 2012; 23:589-597.
36. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target?. *Keio J Med.* 2009; 58:29-40.
37. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473:139-146.

38. Smith MD. The Normal Synovium. *Open Rheumatol J.* 2011; 5:100-106.
39. Eymard F, Chevalier X. Inflammation of the intrapatellar fat pad. *Joint Bone Spine.* 2016; 83:389-393.
40. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* 2012; 51:249-257.
41. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21:16-21.
42. Eitner A, Pester J, Nietzsche S, Hofmann GO, Schaible HG. The innervation of synovium of human osteoarthritic joints in comparison with normal rat and sheep synovium. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21: 1383-1391.
43. Larrañaga-Vera A, Lamuedra A, Pérez-Baos S, Prieto-Potin I, Peña L, Herrero-Beaumont G, Largo R. Increased synovial lipodystrophy induced by high fat diet aggravates synovitis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19:264.
44. Lugo L, Villalvilla A, Gomez R, Bellido M, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA. Effects of PTH [1-34] on synoviopathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20:1619-1630.
45. Hosseini SM, Veldink MB, Ito K, van Donkelaar CC. Is collagen fiber damage the cause of early softening in articular cartilage? *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21:136–143.
46. Arokoski JP, Jurvelin JS, Väättäinen U, Helminen, HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10:186–198.
47. Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R152.
48. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Bellido M, Gómez-Vaquero C, Herrero-Beaumont G. Effects of estrogen deficiency and low bone mineral density on healthy knee cartilage in rabbits. *J Orthop Res.* 2010; 28: 812-818.
49. Anderson-MacKenzie JM, Quasnicka HL, Starr RL, Lewis EJ, Billingham ME, Bailey AJ. Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:224–236.

50. Dieppe P, Cushnaghan J, Young P, Kirwan J. Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis.* 1993; 52: 557–563.
51. Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15:695-700.
52. Sniekers YH, Weinans H, van Osch GJ, van Leeuwen JP. Estrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R182.
53. Michael JW-P, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107:152-162.
54. Ji Q, He C. Extracorporeal shockwave therapy promotes chondrogenesis in cartilage tissue engineering: A hypothesis based on previous evidence. *Med Hypotheses.* 2016; 91:9-15.
55. Ji Q, Wang P, He C. Extracorporeal shockwave therapy as a novel and potential treatment for degenerative cartilage and bone disease: Osteoarthritis. A qualitative analysis of the literature. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016; 121:255-65.
56. Mittermayr R, Antonic V, Hartinger J, Kaufmann H, Redl H, Teot L, Stojadinovic A, Schaden W. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy. *Wound Repair Regen.* 2012; 20: 456e465.
57. Ogden JA, Toth-Kischkat A, Schultheiss R. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res.* 2001; 387:8-17.
58. Moretti B, Iannone F, Notarnicola A, Lapadula G, Moretti L, Patella V, Garofalo R. Extracorporeal shock waves down-regulate the expression of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008; 9:16.
59. Wang CJ, Weng LH, Ko JY, Sun YC, Yang YJ, Wang FS. Extracorporeal shockwave therapy shows chondroprotective effects in osteoarthritic rat knee. *Archives Orthop Trauma Surg.* 2011a; 131:1153-1158.
60. Wang CJ, Weng LH, Ko JY, Wang JW, Chen JM, Sun YC, Yang YJ. Extracorporeal shockwave shows regression of osteoarthritis of the knee in rats. *J Surg Res.* 2011b; 171:601-608.
61. Wang CJ, Sun YC, Wong T, Hsu SL, Chou WY, Chang HW. Extracorporeal shockwave therapy shows time-dependent chondroprotective effects in osteoarthritis of the knee in rats. *J Surg Res* 2012. 178: 196-205.

62. Wang CJ, Hsu SL, Weng LH, Sun YC, Wang FS. Extracorporeal shockwave therapy shows a number of treatment related chondroprotective effect in osteoarthritis of the knee in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013a; 14: 44.
63. Revenaugh MS. Extracorporeal shock wave therapy for treatment of osteoarthritis in the horse: clinical applications. *Veterinary Clin N Am Equine Pract.* 2005; 21:609-625.
64. Chen TW, Lin CW, Lee CL, Chen CH, Chen YJ, Lin TY, Huang MH. The efficacy of shock wave therapy in patients with knee osteoarthritis and popliteal cyamella. *Kaohsiung J Med Sci.* 2014; 30:362-370.
65. Zhao Z, Jing R, Shi Z, Zhao B, Ai Q, Xing G. Efficacy of extracorporeal shockwave therapy for knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *J Surg Res.* 2013; 185: 661-666.
66. Dahlberg J, Fitch G, Evans R, McClure S, Conzemius M. The evaluation of extracorporeal shockwave therapy in naturally occurring osteoarthritis of the stifle joint in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2005; 18: 147-152.
67. Mueller M, Bockstahler B, Skalicky M, Mlacnik E, Lorinson D. Papers & articles. *Veterinary Rec.* 2007; 160: 762-765.
68. Song XJ, Gan Q, Cao JL, Wang ZB, Rupert RL. Spinal manipulation reduces pain and hyperalgesia after lumbar intervertebral foramen inflammation in the rat. *J Manipulative Physiol Ther.* 2006; 29: 5-13.
69. Chapman-Smith D. *Quiropráctica.* 2004. Talleres Gráficos Edelvives, Zaragoza.
70. Sato A, Swenson RS. Sympathetic nervous system response to mechanical stress of the spinal column in rats. *J Manip PhysiolTher.* 1984; 7:141-147.
71. Fuhr AW. *The activator Methods.* 2ªEdición. Ed. Mosby 2009.
72. Liebschner MA, Chun K, Kim N, Ehni B. *In vitro* biomechanical evaluation of single impulse and repetitive mechanical shockwave devices utilized for spinal manipulative therapy. *Ann Biomed Eng.* 2014; 42:2524-36.
73. Colloca CJ, Keller TS, Black P, Normand MC, Harrison DE, Harrison DD. Comparison of mechanical force of manually assisted chiropractic adjusting instruments. *J Manipulative Physiol Ther.* 2005; 28:414-422.
74. Smith DB, Fuhr AW, Davis BP. Skin accelerometer displacement and relative bone movement of adjacent vertebrae in response to chiropractic percussion thrusts. *J Manipulative Physiol Ther.* 1989; 12:26-37.

75. Fuhr AW, Smith DB. Accuracy of piezoelectric accelerometers measuring displacement of a spinal adjusting instrument. *J Manipulative Physiol Ther.* 1986; 9:15-21.
76. Dwyer L, Parkin-Smith GF, Brantingham JW, Korporaal C, Cassa TK, Globe G, Bonnefin D, Tong V. Manual and manipulative therapy in addition to rehabilitation for osteoarthritis of the knee: assessor-blind randomized pilot trial. *J Manipulative Physiol Ther.* 2015; 38:1-21.
77. López-Herradón A, Fujikawa R, Gómez-Marín M, Stedile-Lovatel JP, Mulero F, Ardura JA, Ruiz P, Muñoz I, Esbrit P, Mahillo-Fernández I, Ortega-deMues A. Impact of Chiropractic Manipulation on Bone and Skeletal Muscle of Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int.* 2017; 101:519.
78. Estrategia mundial del sector de la salud contra el VIH, 2016-2021; OMS Junio 2016.
79. Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009; 4:96–103.
80. Erlandson KM, Allshouse AA, Jankowski CM, MaWhinney S, Kohrt WM, Campbell TB. Functional impairment is associated with low bone and muscle mass among persons aging with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013; 63:209–15.
81. Cunha BM, Mota LM, Pileggi GS, Safe IP, Lacerda MV. HIV/AIDS and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2015; 14:396–400.
82. Jiménez B, Sainz T, Díaz L, Mellado MJ, Navarro ML, Rojo P, González-Tomé MI, Prieto L, Martínez J, de José MI, Ramos JT, Muñoz-Fernández MÁ. Madrid cohort of HIV-infected children and adolescents integrated in the pediatric branch of the Spanish national AIDS research network (CoRISpe). Low bone mineral density in vertically HIV-infected children and adolescents: risk factors and the role of T-cell activation and senescence. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36:578–83.
83. Güerri-Fernández R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, García-Giralt N, Villar-García J, Soldado J, González-Mena A, Guelar A, Díez-Pérez A, Brown TT, Knobel H. Bone density, microarchitecture and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS.* 2018; 32:913-920.
84. Focà E, Motta D, Borderi M, Gotti D, Albinì L, Calabresi A, Izzo I, Bellagamba R, Narciso P, Sighinolfi L, Clò A, Gibellini D, Quiros-Roldan E, Brianese N, Cesana BM, Re MC, Torti C. Prospective evaluation of bone markers, parathormone and 1,25-(OH)₂ vitamin D in HIV-positive patients after the initiation of tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir or efavirenz. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:38.
85. Pinzone MR, Moreno S, Cacopardo B, Nunnari G. Is there enough evidence to use bisphosphonates in HIV-infected patients? A systematic review and meta-analysis. *AIDS Rev.* 2014; 16:213-222.

86. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, May 30, 2018.
87. Panel Members of European AIDS Clinical Society (EACS). European Guidelines for treatment of HIV-positive adults in Europe version 9.0. EACS, October 2017.
88. Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GESIDA/Plan nacional sobre el sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2018). SEIMC, January 2018.
89. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, DeJesus E, Suleiman JM, Miller MD, Coakley DF, Lu B, Toole JJ, Cheng AK. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*. 2004; 292:191-201.
90. Arribas JR, Pozniak AL, Gallant JE, Dejesus E, Gazzard B, Campo RE, Chen SS, McColl D, Holmes CB, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK. Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naive patients: 144-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 47: 74- 78.
91. Squires K, Pozniak AL, Pierone G, Steinhart CR, Berger D, Bellos NC, Becker SL, Wulfsohn M, Miller MD, Toole JJ, Coakley DF, Cheng A. Tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside-resistant HIV-1 infection: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2003; 139: 313-320.
92. Chen R, Scherzer R, Hsue PY, Jotwani V, Estrella MM, Horberg MA, Grunfeld C, Shlipak MG. Association of tenofovir use with risk of incident heart failure in HIV-infected patients. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6: 1-11.
93. Fernández-Lisón LC, Vázquez Domínguez B, Rodríguez Gómez FJ, Hevia-Alonso A and Pujol-de la Llave E. Use study of tenofovir DF in highly active anti-retroviral therapy. *An Med Interna*. 2006; 23: 573-576.
94. Izzedine H, Hulot JS, Vittecoq D, Gallant JE, Staszewski S, Launay-Vacher V, Cheng A, Deray G. Long-term renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients. Data from a double-blind randomized active-controlled multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20:743-746.

95. Zimmermann AE, Pizzoferrato T, Bedford J, Morris A, Hoffman R, Braden G. Tenofovir-associated acute and chronic kidney disease: a case of multiple drug interactions. *Clin Infect Dis*. 2006; 42:283-290.
96. Sax PE, Wohl D, Yin MT, Post F, DeJesus E, Saag M, Pozniak A, Thompson M, Podzamczar D, Molina JM, Oka S, Koenig E, Trottier B, Andrade-Villanueva J, Crofoot G, Custodio JM, Plummer A, Zhong L, Cao H, Martin H, Callebaut C, Cheng AK, Fordyce MW, McCallister S. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet*. 2015; 385: 606-2615.
97. Wang H, Lu X, Yang X, Xu N. The efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral regimens for HIV-1 therapy Meta-analysis. *Medicine*. 2016; 95:5146.
98. Gallant JE, Daar ES, Raffi F, Brinson C, Ruane P, DeJesus E, Johnson M, Clumeck N, Osiyemi O, Ward D, Morales-Ramirez JJ, Yan M, Abram ME, Plummer A, Cheng AK, Rhee MS. Efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate given as fixed-dose combinations containing emtricitabine as backbones for treatment of HIV-1 infection in virologically suppressed adults: a randomised, double-blind, active-controlled phase 3 trial. *Lancet HIV*. 2016; 3:158-165.
99. Titanji K, Vunnavu A, Sheth A, Delille C, Lennox J, Sanford SE, Foster A, Knezevic A, Easley KA, Weitzmann MN, Ofotokun I. Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection. *PLoS Pathog*. 2014; 10: e1004497.
100. Ofotokun I, Titanji K, Vunnavu A, Roser-Page S, Vikulina T, Villinger F, Rogers K, Sheth AN, Lahiri CD, Lennox JL, Weitzmann MN. Antiretroviral therapy induces a rapid increase in bone resorption that is positively associated with the magnitude of immune reconstitution in HIV infection. *AIDS*. 2016b; 30: 405–414.
101. Ofotokun I, Titanji K, Vikulina T, Roser-Page S, Yamaguchi M, Zayzafoon M, Williams IR, Weitzmann MN. Role of T-cell reconstitution in HIV-1 antiretroviral therapy-induced bone loss. *Nat Commun*. 2015; 6: 8282.
102. Pachin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*. 2000; 10:473-474.

103. Yen MR, Saier MH Jr. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007; 94:5-14.
104. Barranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 2004; 83:706-716.
105. Wang J, Dahl G. SCAM analysis of Panx1 suggests a peculiar pore structure. *J Gen Physiol.* 2010; 136:515-527.
106. Velasquez S, Eugenin EA. Role of pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol.* 2014; 5:96.
107. Orellana JA, Velasquez S, Williams DW, Saez JC, Berman JW, Eugenin EA. Pannexin1 hemichannels are critical for HIV infection of human primary CD4+ T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2013; 94:399–407.
108. Feig JL, Mediero A, Corciulo C, Liu H, Zhang J, Perez-Aso M, Picard L, Wilder T, Cronstein B. The antiviral drug tenofovir, an inhibitor of Pannexin-1-mediated ATP release, prevents liver and skin fibrosis by downregulating adenosine levels in the liver and skin. *PLoS One.* 2017; 12:e0188135.
109. Pastor-Anglada M, Errasti-Murugarren E, Aymerich I, Casado FJ. Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: from absorption to cell signaling. *J Physiol Biochem.* 2007; 63: 97.
110. Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med.* 2013; 34:529-547.
111. Cano-Soldado P, Pastor-Anglada M. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev.* 2012; 32:428-457.

112. Conesa-Buendía FM, Llamas-Granda P, Larrañaga-Vera A, Wilder T, Largo R, Herrero-Beaumont G, Cronstein B, Mediero A. Tenofovir causes bone loss via decreased bone formation and increased bone resorption, which can be counteracted by dipyridamole in mice. *J Bone Miner Res.* 2019; 34:923-938.
113. Mediero A, Wilder T, Reddy VS, Cheng Q, Tovar N, Coelho PG, Witek L, Whatling C, Cronstein BN. Ticagrelor regulates osteoblast and osteoclast function and promotes bone formation *in vivo* via an adenosine-dependent mechanism. *FASEB J.* 2016; 30:3887–3900.
114. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:247-264.
115. Van Calker D, Müller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic amp in cultured brain cells. *J Neurochem.* 1979; 33: 999-1005.
116. Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: Interactions with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol.* 1983; 3: 69-80.
117. Fredholm BB, AP II, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—An update. *Pharmacol Rev.* 2011; 63:1-34.
118. Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor ligation inhibits osteoclast formation. *Am J Pathol.* 2012; 180: 775–786.
119. Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A(2A) receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NFκB nuclear translocation. *Br J Pharmacol.* 2013; 169:1372–1388.
120. Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, He W, Mazumder A, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor activation prevents wear particle-induced osteolysis. *Sci Transl Med.* 2012; 4:135-165.
121. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an *in vivo* model of inflammation. *J Clin Invest.* 1993; 92:2675-2682.

122. Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, Di Paola R, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J Rheumatol.* 2011; 38:2119–2129.
123. Russell JM, Stephenson GS, Yellowley CE, Benton HP. Adenosine inhibition of lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion by the osteoblastic cell line MG-63. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81:316–326.
124. Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol.* 2009; 85: 438–444.
125. Gharibi, B. et al. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J. Bone Miner Res.* 2011; 26:2112–2124.
126. Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells: the effects of glutamate and protection by purines. *Bone.* 2006; 39: 542-551.
127. Mediero A, Wilder T, Shah L, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor (A2AR) stimulation modulates expression of semaphorins 4D and 3A, regulators of bone homeostasis. *FASEB J.* 2018; 32:3487-3501.
128. Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J.* 2015; 29:1577-90.
129. Ishack S, Mediero A, Wilder T, Ricci JL, Cronstein BN. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds with either dipyridamole or BMP-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017; 105:366-375.
130. Bekisz JM, Flores RL, Witek L, Lopez CD, Runyan CM, Torroni A, Cronstein BN, Coelho PG. Dipyridamole enhances osteogenesis of three-dimensionally printed bioactive ceramic scaffolds in calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018; 46:237-244.
131. Lopez CD, Diaz-Siso JR, Witek L, Bekisz JM, Gil LF, Cronstein BN, Flores RL, Torroni A, Rodriguez ED, Coelho PG. Dipyridamole Augments Three-Dimensionally Printed Bioactive Ceramic Scaffolds to Regenerate Craniofacial Bone. *Plast Reconstr Surg.* 2019; 143:1408-1419.
132. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996; 4:87-98.

133. Serink RT, Nachemson A, Hansson G. The effect of impact loading on rabbit knee joints. *Acta Orthop Scand.* 1977; 48:250-262.
134. Lavery S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18:S53-65.
135. Tiraloché G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole AR and Lavery S. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1118-1128.
136. Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis-A histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract.* 2002; 198:317–325.
137. Largo R, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Granado R, Ortega L, Egido J, Herrero-Beaumont G. Chronic arthritis aggravates vascular lesions in rabbits with atherosclerosis: a novel model of atherosclerosis associated with chronic inflammation. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:2723–34.
138. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.
139. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville, MD: US Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 2005.
140. Mediero A, Wilder T, Ramkhelawon B, Moore KJ, Cronstein BN. Netrin-1 and its receptor *Unc5b* are novel targets for the treatment of inflammatory arthritis. *FASEB J.* 2016; 30:3835–44.
141. D’Lima DD, Fregly BJ, Patil S, Steklov, Colwell CW Jr. Knee joint forces: prediction, measurement, and significance. *Proc Inst Mech Eng H.* 2012; 226:95-102.
142. Chityala R, Hoffmann KR, Bednarek DR, Rudin S. Region of Interest (ROI) Computed Tomography. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2004; 5368: 534–541.
143. Campbell GM, Sophocleous A. Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and *in vivo* studies. *Bonekey Rep.* 2014; 3:564.
144. Wu Y, Adeeb S, Doschak MR. Using microCT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness - A Case Study on Osteoporosis Rat Bone. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015; 6:80.

145. Anastasia Pilichou, Ioannis Papassotiriou, Kelly Michalakakou, Smaragdi Fessatou, Emmanuel Fandridis, George Papachristou, Evangelos Terpos. High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*. 2008; 41:746-774.
146. Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop*. 2015; 6:95–105.
147. Walsh, DA, Wade, M, Mapp, PI, Blake, DR. Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am J Pathol*. 1998; 152: 691– 702.
148. Ferrara, N, Gerber, HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*. 2001; 106: 148– 56.
149. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain. *J Bone Miner Res*. 2016; 31:911-924.
150. Belluzzi E, Stocco E, Pozzuoli A, Granzotto M, Porzionato A, Vettor R, De Caro R, Ruggieri P, Ramonda R, Rossato M, Favero M, Macchi V. Contribution of Infrapatellar Fat Pad and Synovial Membrane to Knee Osteoarthritis Pain. *Biomed Res Int*. 2019; 2019:6390182.
151. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295:761-767.
152. Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, Sluyter R, Stokes L. Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One*. 2014; 9:e93058.
153. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblasts and chondrocyte differentiation during vertebrae skeletogenesis. *Dev Cell*. 2005; 8: 739-750.
154. Mateo L, Holgado S, Mariñoso ML, Pérez-Andrés R, Bonjoch A, Romeu J, Olivé A. Hypophosphatemic osteomalacia induced by tenofovir in HIV-infected patients. *Clin Rheumatol*. 2016; 35:1271-1279.
155. Hamdy RC, Krishnaswamy G, Cancellaro V, Whalen K and Harvill L. Changes in bone mineral content and density after stroke. *Am J Phys Med Rehabil*. 1993; 72: 88-191.
156. Armirthalingam H, Cicuttini FM, Wang Y, Chou L, Wluka AE, Hussain S. Association between sarcopenia and osteoarthritis-related knee structural changes: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019; 27:S472.

157. Brunner AM, Henn CM, Drewniak EI, Lesieur-Brooks A, Machan J, Crisco JJ, Ehrlich MG. High dietary fat and the development of osteoarthritis in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20:584-592.
158. Wada M, Maezawa Y, Baba H, Shimada S, Sasaki S, Nose Y. Relationships among bone mineral densities, static alignment and dynamic load in patients with medial compartment knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40: 499–505.
159. Thorp LE, Wimmer MA, Block JA, Moisiu KC, Shott S, Goker B, Sumner DR. Bone mineral density in the proximal tibia varies as a function of static alignment and knee adduction angular momentum in individuals with medial knee osteoarthritis. *Bone*. 2006; 39: 1116–1122.
160. Petrisor B, Lisson S, Sprague S. Extracorporeal shockwave therapy: A systematic review of its use in fracture management. *Indian J Orthop*. 2009; 43:161-167.
161. Shi L, Gao F, Sun W, Wang B, Guo W, Cheng L, Li Z, Wang W. Short-term effects of extracorporeal shock wave therapy on bone mineral density in postmenopausal osteoporotic patients. *Osteoporos Int*. 2017; 28: 2945-2953.
162. Longo AB, Salmon PL, Ward, WE. Comparison of ex vivo and in vivo micro-computed tomography of rat tibia at different scanning settings. *J Orthop Res*. 2017; 35: 1690-1698.
163. Isaksson H, Töyräs J, Hakulinen M, Aula AS, Tamminen I, Julkunen P, Kröger H, Jurvelin JS. Structural parameters of normal and osteoporotic human trabecular bone are affected differently by microCT image resolution. *Osteoporos Int*. 2011; 22:167-77.
164. Christiansen BA. Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice. *Bone Rep*. 2016; 5:136-140.
165. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011; 61:76-85.
166. Chiba, K, Ito M, Osaki M, Uetani M, Shindo H. *In vivo* structural analysis of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the hip using multi-detector row CT. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19:180 – 185.
167. Van der Jagt, Piscaer TM, Schaden W, Li J, Kops N, Jahr H, van der Linden JC, Waarsing JH, Verhaar JA, de Jong M, Weinans H. Unfocused Extracorporeal Shock Waves Induce Anabolic Effects in Rat Bone. *J Bone Joint Surg Am*. 2011; 93:38-48.
168. Ching-Jen Wang, Kuender D Yang, Feng-Sheng Wang, Chia-Chen Hsu, Hsiang-Ho Chen. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone*. 2004; 34: 225-230.

169. Wang P, Liu C, Yang XT, Wei XF, Zhou YJ, Yang L, He CQ. Effect of extracorporeal shock wave therapy on cartilage and subchondral bone remodeling in rabbits with ACLT-induced osteoarthritis. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban*. 2014; 45:120-5.
170. Arunakul M, Tochigi Y, Goetz JE, Diestelmeier BW, Heiner AD, Rudert J, Fredericks DC, Brown TD, McKinley TO. Replication of chronic abnormal cartilage loading by medial meniscus destabilization for modeling osteoarthritis in the rabbit knee *in vivo*. *J Orthop Res*. 2013; 31:1555-1560.
171. Bendele AM, Bean JS, Hulman JF. Passive role of articular chondrocytes in the pathogenesis of acute meniscectomy-induced cartilage degeneration. *Vet Pathol*. 1991; 28:207-15.
172. Alenxander PG, McCarron JA, Levine MJ, Melvin GM, Murray PJ, Manner PA, Tuan RS. An *in vivo* lapine model for impact-induced injury and osteoarthritic degeneration of articular cartilage. *Cartilage*. 2012; 3:323-333.
173. Horisberger M, Fortuna R, Valderrabano V, Herzog W. Long-term repetitive mechanical loading of the knee joint by *in vivo* muscle stimulation accelerates cartilage degeneration and increases chondrocyte death in a rabbit model. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2013; 28:536-543.
174. Brophy RH, Martinez M, Borrelli J Jr, Silva MJ. Effect of combined traumatic impact and radical transaction of medial meniscus on knee articular cartilage in a rabbit *in vivo* model. *Arthroscopy*. 2012; 28:1490-1496.
175. Brandt KD, Thonar EJ. Lack of association between serum keratin sulfate concentrations and cartilage changes of osteoarthritis after transaction of the anterior cruciate ligament in the dog. *Arthritis Rheum*. 1989; 32:647-651.
176. Desrochers J, Amrein MA, Matyas JR. Structural and functional changes of the articular surface in a post-traumatic model of early osteoarthritis measured by atomic force microscopy. *J Biomech*. 2010; 43:3091-3098.
177. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong LT. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*. 2004; 50:1193-1206.
178. Fischenich KM, Button KD, DeCamp C, Haut RC, Donahue TL. Comparison of two models of post-traumatic osteoarthritis; temporal degradation of articular cartilage and menisci. *J Orthop Res*. 2017; 35:486-495.

179. Hanashi D, Koshino T, Uesugi M, Saito T. Effect of femoral nerve resection on progression of cartilage degeneration induced by anterior cruciate ligament transaction in rabbits. *J Orthop Sci.* 2002; 7:672-676.
180. Berjon JJ, Munuera L, Calvo M. Degenerative lesions in the articular cartilage after meniscectomy: preliminary experimental study in dogs. *J Trauma.* 1991; 31:342-350.
181. Cacke MA, Read RA, Guillou B, Ghosh P. Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU). *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8:404-411.
182. Amiable N, Martel-Pelletier J, Lussier B, Kwan Tat S, Pelletier JP, Boileau C. Proteinase-activated receptor-2 gene disruption limits the effect of osteoarthritis on cartilage in mice: a novel target in joint degradation. *J Rheumatol.* 2011; 38:911-920.
183. Upton AR, Holding CA, Dharmapatni AA, Haynes DR. The expression of RANKL and OPG in the various grades of osteoarthritic cartilage. *Rheumatol Int.* 2012; 32:535-540.
184. Wang CJ, Cheng JH, Chou SL, Chen JH, Huang CY. Changes of articular cartilage and subchondral bone after extracorporeal shockwave therapy in osteoarthritis of the knee. *Int J Med Sci.* 2017; 14:213-223.
185. Wang CJ, Huang CY, Hsu SL, Chen JH, Cheng JH. Extracorporeal shockwave therapy in osteoporotic osteoarthritis of the knee in rats: an experiment in animals. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16:R139.
186. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, Yang LC. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *J Orthop Res.* 2003; 21:984-989.
187. Cheng JH, Wang CJ. Biological mechanism of shockwave in bone. *Int J Surg.* 2015; 24(Pt B):143-146.
188. Ochiai N, Ohtori S, Sasho T, Nakagawa K, Takahashi K, Takahashi N, Murata R, Takahashi K, Moriya H, Wada Y, Saisu T. Extracorporeal shock wave therapy improves motor dysfunction and pain originating from knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15:1093-1096.
189. Sellam J, Berenbaum. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.* 2010; 6:625-635.
190. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation.* 2014:561459.

191. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Current Rheumatology Reports*. 2000; 2:459-465.
192. Teodorczyk-Injeyan JA, Injeyan HS, Ruegg R. Spinal manipulative therapy reduces inflammatory cytokines but not substance P production in normal subjects. *J Manipulative Physiol Ther*. 2006; 29:14-21.
193. Roy RA, Boucher JP, Comtois AS. Inflammatory response following a short-term course of chiropractic treatment in subjects with and without chronic low back pain. *J Chiropr Med*. 2010; 9:107-114.
194. Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci* 2000; 85:141-147.
195. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859.
196. Blalock JE. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J Exp Med* 2002; 195:F25-28.
197. Straub RH, Besedovsky HO. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J* 2003; 17:2176-83.
198. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44:7-16.
199. Gurzu S, Turdean SG, Pop ST, Zazgyva A, Roman CO, Opris M, Jung I. Different synovial vasculogenic profiles of primary, rapidly destructive and osteonecrosis-induced hip osteoarthritis. An immunohistochemistry study. *Int Orthop*. 2017; 41: 1107.
200. Han PF, Wei L, Duan ZQ, Zhang ZL, Chen TY, Lu JG, Zhao RP, Cao XM, Li PC, Lv Z, Wei XC. Contribution of IL-1 β , 6 and TNF- α to the form of post-traumatic osteoarthritis induced by "idealized" anterior cruciate ligament reconstruction in a porcine model. *Int Immunopharmacol*. 2018; 65:212-220.
201. Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F. Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis-chondrocytes in focus. *Cell Signal*. 2019; 53:212-223.
202. Frederick ED, Hausburg MA, Thomas GW et al. The low molecular weight fraction of human serum albumin upregulates COX2, prostaglandin E2, and prostaglandin D2 under inflammatory conditions in osteoarthritic knee synovial fibroblasts. *Biochem and Biophys Rep*. 2016; 8: 68–74.

203. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: “vascular rheumatology”. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:224.
204. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.* 2002; 39:237-246.
205. Takamatsu H, Kumanogoh A. Diverse roles for semaphoring-plexin signaling in the immune system. *Trends in immunology* 2012; 33: 127-135.
206. Takagawa S, Nakamura F, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, Saito T. Decreased Semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013; 14:40.
207. Liang Y, Wang W, Huang J, Tan H, Liu T, Shang C, Liu D, Guo L, Yao S. Potential role of semaphorin 3A and its receptors in regulating aberrant sympathetic innervation in peritoneal and deep infiltrating endometriosis. *PloS One.* 2015; 10:e0146027.
208. Hayashi M, Kamiya Y, Itoh H, Higashi T, Miyazaki T, Funakoshi K, Yamashita N, Goshima Y, Andoh T, Yamada Y, Goto T. Intrathecally administered Sema 3A protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neurosci Res.* 2011; 69:17-24.
209. Wu CH, Yuan XC, Gao F, Li HP, Cao J, Liu YS, Yu W, Tian B, Meng XF, Shi J, Pan HL, Li M. Netrin-1 Contributes to Myelinated Afferent Fiber Sprouting and Neuropathic Pain *Mol Neurobiol.* 2016; 53: 5640.
210. Schubert T, Denk A, Mägdefrau U, Kaufmann S, Bastone P, Lowin T, Schedel J, Bosserhoff AK. Role of the netrin system of repellent factor son sinovial fibroblasts in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009; 22: 715-722.
211. Okubo M, Kimura T, Fujita Y, Mochizuki S, Niki Y, Enomoto H, Suda Y, Toyama Y, Okada Y. Semaphorin 3A is expressed in human osteoarthritic cartilage and antagonizes vascular endothelial growth factor 165–promoted chondrocyte migration: An implication for chondrocyte cloning. *Arthritis Rheumatism.* 2011, 63: 3000–3009.
212. Yin P, Houchen Lv, Zhang L, Zhang L, Tang P. Semaphorin 3A: A potential target for low back pain. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:216.
213. Vieira JM, Schwarz Q, Ruhrberg C. Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development.* 2007; 134:1833-1843.
214. Tu T, Zhang C, Yan H, Luo Y, Kong R, Wen P, Ye Z, Chen J, Feng J, Liu F, Wu JY, Yan X. CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res.* 2015; 25:275-287.

215. Wilson BD, li M, Park KW, Suli A, Sorensen LK, Larrieu-Lahargue F, Urness LD, Suh W, Asai J, Kock GA, Thorne T, Silver M, Thomas KR, Chien CB, Losordo DW, Li DY. Netrins promote development and therapeutic angiogenesis. *Science*. 2006; 313:640-644.
216. Malykhina AP, Lei Q, Erickson CS, Epstein ML, Saban MR, Davis CA, Saban R. VEGF induces sensory plasticity, alters bladder function, and promotes visceral sensitivity. *BMC Physiol*. 2012; 12:15.
217. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem*. 2014; 129: 169-178.
218. Koch K, Chen Y, Fen JY, Borroto-Esoda K, Deville-Bonne D, Janin J, Moréra S. Nucleoside diphosphate kinase and the activation of antiviral phosphonate analogs of nucleotides: binding mode and phosphorylation of tenofovir derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009; 28: 776-792.
219. Grigsby IF, Pham L, Gopalakrishnan R, Mansky LM, Mansky KC. Downregulation of Gnas, Got2 and Snord32a following tenofovir exposure of primary osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 39: 1324–9.
220. Cummins NW, Klicpera A, Sainski AM, Bren GD, Khosla S, Westendorf JJ, Badley AD. Human immunodeficiency virus envelope protein Gp120 induces proliferation but not apoptosis in osteoblasts at physiologic concentrations. *PLoS One*. 2011; 6:e24876.
221. Barbieri AM, Chiodini I, Ragni E, Colaianni G, Gadda F, Locatelli M, Lampertico P, Spada A, Eller-Vainicher C. Suppressive effects of tenofovir disoproxil fumarate, an antiretroviral prodrug, on mineralization and type II and type III sodium-dependent phosphate transporters expression in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2018; 119: 4855–66.
222. Vikulina T, Fan X, Yamaguchi M, Roser-Page S, Zayzafoon M, Guidot DM, Ofotokun I, Weitzmann MN. Alterations in the immuno-skeletal interface drive bone destruction in HIV-1 transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:13848-13853.
223. Shaikh G, Zhang J, Perez-Aso M, Mediero A, Cronstein B. Adenosine A2A receptor promotes collagen type III synthesis via b-catenin activation in human dermal fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2016; 173:3279–91.
224. Conradie MM, van de Vyver M, Andrag E, Conradie M, Ferris WF. A direct comparison of the effects of the antiretroviral drugs stavudine, tenofovir and the combination lopinavir/ritonavir on bone metabolism in a rat model. *Calcif Tissue Int*. 2017; 101:422–32.

225. Badiou S, De Boever CM, Terrier N, Baillat V, Cristol JP, Reynes J. Is tenofovir involved in hypophosphatemia and decrease of tubular phosphate reabsorption in HIV-positive adults?. *J Infect.* 2006; 52: 335–8.
226. Day SL, Leake Date HA, Bannister A, Hankins M, Fisher M. Serum hypophosphatemia in tenofovir disoproxil fumarate recipients is multifactorial in origin, questioning the utility of its monitoring in clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:301–4.
227. Orkin C, Molina JM, Negredo E, et al. Efficacy and safety of switching from boosted protease inhibitors plus emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate regimens to single-tablet darunavir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir alafenamide at 48 weeks in adults with virologically suppressed HIV-1 (EMERALD): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *Lancet HIV.* 2018; 5:23-34.
228. Yin MT, Shiao S, Rimland D, Gilbert CL, Bedimo RJ, Rodriguez-Barradas MC, Harwood K, Aschheim J, Justice AC, Womack JA. Fracture Prediction With Modified-FRAX in Older HIV-Infected and Uninfected Men. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016; 72:513–520.

APÉNDICE

LISTADO DE PUBLICACIONES QUE CONTRIBUYEN A LA TESIS

- **Conesa-Buendía FM**, Llamas-Granda P, Larrañaga-Vera A, Wilder T, Largo R, Herrero-Beaumont G, Cronstein B, Mediero A. *Tenofovir causes bone loss via decreased bone formation and increased bone resorption, which can be counteracted by dipyridamole in mice*. **Journal of Bone and Mineral Research (JBMR)** 2019; 34(5):923-938.
- Atencio P, Cabello A, **Conesa-Buendía FM**, Pérez-Tanoira R, Prieto-Pérez L, Álvarez B, Aboiro R, Díaz-Curiel M, Fernández-Guerrero M, Herrero-Beaumont G, Mediero A, Górgolas M. *Bone involvement in HIV-infected, antiretroviral-treatment-naïve men who have sex with men*. **PloS One**. Julio 2019 (enviado).
- **Conesa-Buendía FM**, Mediero A, Fujikawa R, Mulero F, Esbrit P, Ortega-de Mues A. *Changes in subchondral bone status, cartilage and synovial membrane in response to chiropractic manipulation in an osteoarthritis model*. **Calcified Tissue International**. Septiembre 2019 (enviado).
- Atencio P*, **Conesa-Buendía FM***, Cabello A, Llamas-Granda P, Mahillo-Fernández I, Largo R, Herrero-Beaumont G, Mediero A, Górgolas M. *Changes in bone metabolism and bone markers in naïve HIV patients at 12 and 48 weeks after beginning of antiretroviral treatment*. Septiembre 2019 (en preparación).
- **Conesa-Buendía FM**, Atencio P, Cabello A, Mahillo-Fernández I, Largo R, Herrero-Beaumont G, Górgolas M, Mediero A. *Comparative effects of tenofovir and other antiretroviral drugs on the inflammatory state of naïve HIV-patients at basal and after 3 and 12 months post-treatment*. Septiembre 2019 (en preparación).

OTRAS PUBLICACIONES

- Aguilera-Correa JJ, Mediero A, **Conesa-Buendía FM**, Conde A, Arenas MA, de Damborenea JJ, Esteban J. *Microbiological and cellular evaluation of a fluorine-phosphorus-doped titanium alloy, a novel antibacterial and osteostimulatory biomaterial with potential applications in orthopedic surgery*. **Appl Environ Microbiol**. 2019; 85(2).pii: e0227118.

Tenofovir Causes Bone Loss via Decreased Bone Formation and Increased Bone Resorption, Which Can Be Counteracted by Dipyridamole in Mice

Francisco Miguel Conesa-Buendía,¹ Patricia Llamas-Granda,¹ Ane Larrañaga-Vera,² Tuere Wilder,² Raquel Largo,¹ Gabriel Herrero-Beaumont,¹ Bruce Cronstein,² and Aránzazu Mediero^{1,2}

¹Bone and Joint Research Unit, IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM, Madrid, Spain

²Division of Translational Medicine, Department of Medicine, NYU School of Medicine, New York, NY, USA

ABSTRACT

Osteopenia and fragility fractures have been associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection. Tenofovir, a common antiviral in HIV treatment, also leads to increases in bone catabolism markers and decreased BMD in children and young adults. In murine models and human cell lines, tenofovir inhibits adenosine triphosphate release and decreases extracellular adenosine levels. Adenosine and adenosine A2A receptor inhibit osteoclast formation, and increase local adenosine concentration with dipyridamole, an agent that blocks adenosine cellular uptake and stimulates new bone formation as well as bone morphogenetic protein 2. We hypothesized that tenofovir regulates bone resorption by diminishing endogenous adenosine levels and questioned whether dipyridamole may be a useful treatment to counteract the deleterious bone effects of tenofovir. Primary murine osteoclasts were induced by M-CSF/RANKL, and the number of TRAP-positive cells was studied after challenge with tenofovir alone or in combination with dipyridamole. Differentiation markers were studied by RT-PCR and MAPK/NFκB expression by Western blot. Male C57Bl/6 mice were treated as follows: saline 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/day, dipyridamole 25 mg/kg/day, combination tenofovir/dipyridamole ($n = 10$, 4 weeks). Calcein/Alizarin Red-labeling of newly formed bone was used, and long bones were prepared for micro-computed tomography (μ CT)/histology. Tenofovir produced a dose-dependent increase in osteoclast differentiation ($EC_{50} = 44.5$ nM) that was reversed by dipyridamole ($IC_{50} = 0.3$ μ M). Tenofovir increased cathepsin K and NFATc1 mRNA levels and dipyridamole reversed the effect. Dipyridamole reversed the effect of tenofovir on pERK1/2, pp38, and NFκB nuclear translocation. Mice treated with tenofovir lost nearly 10% of their body weight ($p < 0.001$). μ CT revealed decreased BMD and altered trabecular bone in tenofovir-treated mice, reversed by dipyridamole. TRAP-staining showed increased osteoclasts in tenofovir-treated mice ($p < 0.005$), an effect reversed by dipyridamole. Similar results were obtained for cathepsin K and CD68. RANKL-positive cells were increased in tenofovir-treated mice, whereas osteoprotegerin-positive cells were decreased; both effects were reversed by dipyridamole. These results suggest that treatment with agents that increase local adenosine concentrations, like dipyridamole, might prevent bone loss following tenofovir treatment. © 2019 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: TENOFOVIR; DIPYRIDAMOLE; HIV; BONE TURNOVER; OSTEOPENIA

Introduction

Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is principally known for its immunologic effects as it replicates mainly in CD4+ T lymphocytes and in monocytes/macrophages leading to severe lymphopenia and immunodeficiency. HIV infection also affects other tissues and organs such as the heart, kidney, and liver, as well as the central nervous system and the musculoskeletal system with changes similar to those seen in aging, such as increasing frailty, sarcopenia, obesity, and osteoporosis.⁽¹⁾ Although little is known regarding the pathogenesis of the premature changes in body and bone composition in HIV-positive patients, it is likely that these changes are

caused by the virus, antiretroviral therapies, or chronic inflammation.⁽¹⁾

For nearly two decades, bone alterations have been observed in the course of HIV infection, with particularly notable decreases in BMD and increased frequency of fractures as a result of fragility.⁽²⁾ It is not clear if it is HIV infection per se that contributes to the decrease in BMD or whether the risk factors associated with the disease (malnutrition, low body weight, high index of smoking and alcohol consumption, vitamin D decrease) contribute to this increase in osteoporosis.⁽³⁾ In addition, it is hypothesized that increased bone turnover may be caused by a complex interaction of T cells with osteoclasts and osteoblasts likely influenced by both HIV

Received in original form May 14, 2018; revised form December 4, 2018; accepted January 5, 2019. Accepted manuscript online January 15, 2019.

Address correspondence to: Aránzazu Mediero, Bone and Joint Research Unit, IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM, Avda. Reyes Católicos 2, Madrid 28040, Spain. E-mail: aranzazu.mediero@quironsalud.es

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. xx, No. xx, Month 2018, pp 1–16

DOI: 10.1002/jbmr.3665

© 2019 American Society for Bone and Mineral Research

and HAART (highly active antiretroviral therapy).⁽⁴⁾ A meta-analysis in global HIV populations (patients naïve with those treated with HAART) from 1994 to 2005, showed a 6.4-fold increase in osteopenia in men aged between 30 and 40 years and a 3.7-fold increase in osteoporosis in women aged 35 to 75 years old compared with healthy individuals.⁽³⁾ In adults, the decrease in BMD has also been associated with prolonged treatment with tenofovir,^(5,6) indicating that medication effects may contribute to the initial increase in loss of BMD after the start of treatment with HAART. In addition, the usual long-term therapies administered to prevent loss of bone have not been demonstrated to have effect in this individual such as denosumab.⁽¹⁾ Pinzone and colleagues found that bisphosphonates increased BMD at the lumbar spine, hip, and femoral neck after 48 and 96 weeks of treatment in HIV patients.⁽⁷⁾ However, most of the studied patients were young men with well-controlled HIV and low risk of fracture.

Both osteoblasts and osteoclasts are affected directly or indirectly by the virus, altering osteoblastogenesis and osteoclastogenesis.⁽⁸⁾ However, antiretroviral drugs may have a direct or indirect effect on bone cells, via alterations in RANK/RANKL, production of cytokines, mitochondrial function, phosphate metabolism, and metabolism of vitamin D.⁽⁸⁾ Some studies correlate HAART therapy with changes in bone and inflammatory markers^(9,10) and compare treatments with and without tenofovir,⁽¹⁰⁾ although there are no data on mechanisms related to the effect of tenofovir on bone metabolism.

Tenofovir is a nucleoside-based drug that, as an adenosine monophosphate (AMP) analogue, is taken up by cells and phosphorylated to nucleotides that inhibit HIV reverse transcriptase. Tenofovir treatment produces a significant decrease in adenosine levels in two models of murine fibrosis leading to a decrease in fibrosis.⁽¹¹⁾ Tenofovir diminishes extracellular adenosine concentrations by inhibiting, in a dose-dependent fashion, cellular adenosine triphosphate (ATP) release through inhibition of pannexin-1, a channel that transports ATP into the extracellular space.⁽¹¹⁾

Adenosine is generated both intracellularly and extracellularly from the hydrolysis of adenine nucleotides, and acts locally to mediate its physiological and pharmacological actions via activation of specific receptors coupled to G proteins (A1, A2A, A2B, and A3). The adenosine receptors each have a unique and selective pharmacological profile and various adenosine receptors are expressed in different tissues and cell types.⁽¹²⁾ Stimulation of the A2A receptor (A2AR) inhibits osteoclast differentiation and function,^(13,14) and deletion of A2AR leads to osteopenia in mice.⁽¹⁵⁾ Moreover, in *in vivo* models of osteolysis, we have shown that activation of the A2AR reduces porosity and erosions in the bone, producing an increase in bone volume compared with control bones.⁽¹⁴⁾ Moreover, we found that activation of A2AR by dipyrindamole, a compound that blocks ENT1 transporter and thereby increases extracellular adenosine levels, stimulates new bone formation as well as bone morphogenic protein 2.⁽¹⁶⁾

As tenofovir blocks ATP release and decreases extracellular adenosine levels, we investigated whether tenofovir treatment affects bone homeostasis in mice. Here we report that tenofovir enhances osteoclast differentiation in an adenosine receptor-dependent fashion *in vitro*, which is reversible by treatment with dipyrindamole. Moreover, tenofovir induces osteopenia *in vivo* and dipyrindamole treatment prevents the development of osteopenia in mice.

Materials and Methods

Reagents

Tenofovir was purchased from Sequoia Research Products (Carbosynth Limited, Berkshire, UK). Recombinant mouse M-CSF and RANKL were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Alpha-modified essential medium (α -MEM), FBS, penicillin/streptomycin, and Alexa Fluor 555 phalloidin were from Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Dipyrindamole, naphthol AS MX phosphate disodium salt, fast red violet LB salt, radioimmunoprecipitation assay buffer, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail, calcein, Alizarin Red, and sodium tetraborate were from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Sodium acetate, glacial acetic acid, sodium tartrate and toluidine blue were from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Goat anti-rabbit-HRP and goat anti-mouse-HRP were from GE Healthcare (Fisher Scientific). Primary antibodies against pERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38, pJNK, JNK, total β -catenin, and de-phospho- β -catenin (Ser^{33/37}/Thr⁴¹) were from Cell Signaling (Werfen, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). The primary antibodies against cathepsin K, CD68, RANKL, osteoprotegerin (OPG), alkaline phosphatase, and collagens I and III were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). The primary antibody against sclerostin was from Abcam (Cambridge, UK).

Osteoclast differentiation

Bone marrow cells (BMCs) were isolated from 6- to 8-week-old female C57BL/6 mice as previously described.⁽¹⁵⁾ Briefly, the marrow cavity was flushed out with α -MEM from aseptically removed femora and tibia, and marrow was incubated overnight in α -MEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin to obtain a single-cell suspension. There were 200,000 non-adherent cells collected and seeded in α -MEM with 30 ng/mL M-CSF for 2 days. At day 3 (day 0 of differentiation), 30 ng/mL RANKL was added to cultures in the presence/absence of tenofovir (10 μ M to 1 nM) alone or in combination with dipyrindamole (10 μ M to 1 nM; $n = 5$). Medium and reagents were replaced every third day. After incubation for 7 days, cells were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclast quantification as previously described.^(14,15,19) The number of TRAP-positive multinucleated cells containing ≥ 3 nuclei/cell was scored.⁽¹⁷⁾

To assay resorption activity, 200,000 nonadherent cells were collected and seeded on dentin slides (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ, USA), and were treated under the same conditions as described for TRAP staining. After 7 days of differentiation, resorption was assayed by staining the dentin slides with 1% toluidine blue in 0.5% sodium tetraborate solution following the manufacturer's recommendations. The pits developed a blue-to-purple color.

Osteoblast differentiation

Osteogenesis assays were performed as previously described.⁽¹⁸⁾ BMCs from 8-week C57BL/6 female mice were isolated by flushing out the bone marrow cavity. Adherent BMCs were seeded at a density of 1×10^5 cell/cm² density with osteogenic medium (α -MEM containing 1 μ M dexamethasone, 50 μ g/mL ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate) in the presence/absence of tenofovir (10 μ M to 1 nM) alone or in combination with dipyrindamole (10 μ M to 1 nM; $n = 5$). Alizarin Red staining was performed 14 days after culture. Cells were fixed in 4% and

stained for 45 min with 2% Alizarin Red. Staining intensity (the intensity of red color) was quantified using SigmaScan Pro5 software (Systat Software, San Jose, CA, USA). In all experiments, DMSO was added to the control medium.

Permanent knockdown of cellular transporters

To transfect shRNA, RAW264.7 cells (15,000 cells/mL) were plated and 24 hours later cells were incubated in hexadimethrine bromide (4 µg/mL) and 10⁸ lentiviral transduction particles corresponding to mouse pannexin-1 (SHCLNV-NM_019482), and mouse connexin-43 (SHCLNV-NM_010288.3), with puromycin selection marker, for another 24 hours to allow transfection. Media were then replaced with α-MEM containing puromycin (1 µg/mL); the media were changed every 3 days until selected clones formed. These clones were isolated and expanded until confluence. Scrambled shRNA (SHC002V) was used as control.

Quantitative real-time RT-PCR

To validate the effect of dipyrindamole on tenofovir osteoclast/osteoblast differentiation, the expression of osteoclast/osteoblast markers was analyzed by RT-PCR ($n = 6$). Cells were cultured in tenofovir 1 µM or dipyrindamole 1 µM, or in a combination of both; cathepsin K, NFATc1, osteopontin, RANKL, and OPG were analyzed. Total RNA was extracted using E.Z.N.A. HP Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, VWR International, Norcross, GA, USA) following the manufacturer's protocol. Total RNA was retrotranscribed using MuLV Reverse Transcriptase PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 2.5 U/µL, including in the same reaction the following reagents from Applied Biosystems: rnaase inhibitor 1 U/µL, random hexamers 2.5 U/µL, MgCl₂ 5mM, PCR buffer II 1×, and dNTPs 1mM. Relative quantification of gene expression was performed using real-time RT-PCR on a Step One Plus with Power UP SYBR Green MasterMix (both from Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. The following primers were used in real-time PCR amplification: cathepsin K forward: 5'-GCTGAACTCAGGACCTCTGG-3' and reverse: 5'-GAAAAGGGAGG-CATGAATGA-3'; NFATc1 forward: 5'-TCATCCTGTCCAACACAAA-3' and reverse: 5'-TCACCTGGTTCCTCCTC -3'; osteopontin forward: 5'-TCTGATGAGACCTCACTGC-3' and reverse: 5'-TCTCCTGGCTCTCTTGGAA-3'; mouse RANKL forward 5'-AGCCGA-GACTACGGCAAGTA-3' and reverse 5'-GCGCTCGAAAGTACAG-GAAC-3'; mouse OPG forward 5'-CTGCCTGGGAAGAAGATCAG-3' and reverse 5'-TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC-3'; and GAPDH forward: 5'-CTACACTGAGGACCAGTTGTCT-3' and reverse: 5'-GGTCTGGGATGGAAATTGTG-3'. The Pfaffl method⁽¹⁹⁾ was used for relative quantification.

Western blot

Primary murine BMCs were treated with dipyrindamole 1 µM or tenofovir 1 µM, or in a combination of both ($n = 5$ each) in the presence of M-CSF/RANKL or osteogenic media. Combination treatments were done as follows: either dipyrindamole pretreatment for 30 min before tenofovir challenge or tenofovir pretreatment before dipyrindamole challenge. Cells were lysed with RIPA buffer at different time points. Cytoplasmic and nuclear fraction protein extraction was performed using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid. Then 4 µg of protein were subjected to 7.5% or 10% SDS-PAGE and transferred to a

nitrocellulose membrane. Nonspecific binding was blocked with TBS/Tween-20 0.05% to 3% BSA. Membranes were incubated overnight (4°C) with primary antibodies pERK1/2 1:1000, p-p38 1:1000, pJNK 1:500, p50/p105 NFκB 1:5000, IκB alpha 1:500, p-IκB alpha 1:500 total β-catenin 1:1000, and de-phospho-β-catenin (Ser^{33/37}/Thr⁴¹) 1:1000. Membranes were incubated with goat anti-rabbit HRP 1:5000 or goat anti-mouse HRP 1:5000. Bands were visualized by Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Reprobing with ERK1/2, p38, JNK, or actin (to check that all lanes were loaded with the same amount of protein) was performed. Specific nuclear signal was detected using histone H3 diluted 1:1000. To quantify the Western blot analysis, digital densitometric band analysis was performed with Quantity One software (Bio-Rad, Madrid, Spain), and band intensities were expressed relative to ERK2, p38, JNK, actin, or histone H3, as appropriate. Variations in intensity were determined as a percentage of control and expressed as mean ± SEM. All results were calculated as a percentage of nonstimulated controls to minimize the intrinsic variation among different experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Bonferroni posttest (the levels of significance are indicated in the fig. legends).

β-catenin immunocytochemistry

To identify the activation and nuclear translocation of β-catenin, adherent BMCs cells were plated on glass coverslips (Lab-Tek II chamber slide, 8-well; ThermoFisher Scientific) and treated with osteogenic media in tenofovir 1 µM or dipyrindamole 1 µM, or in a combination of both. After fixation with cold 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, cells were washed with PBS twice and PBS BSA 3% and blocked with PBS BSA 3% Triton X-100 0.5% FBS 5% for 1 hour at room temperature. Next, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against β-catenin (1:200) and de-phospho-β-catenin (Ser^{33/37}/Thr⁴¹ 1:200). Then, cells were washed with PBS BSA 3% and incubated with goat anti-rabbit IgG- (whole molecule) FITC for 1 hour at room temperature in the dark. After being washed, cells were counterstained with Fluoroshield with DAPI mounting media (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Images were observed under fluorescence microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with Act1 software, Nikon, Melville, NY.

Dose determination of antiviral therapy

Dose determination was performed via conversion of animal doses to human equivalent doses based on body surface area.^(10,20)

Mice

All protocols followed internationally recognized guidelines and were approved by the NYU School of Medicine's Institutional Animal Care and Use Committee and the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA). The experimental protocol was approved by the Institutional Ethics and Welfare Committee of the Health Research Institute Jiménez Díaz Foundation (Madrid, Spain).

Male C57Bl/6 mice were divided into four groups: saline 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/day, dipyrindamole 25 mg/kg/day, combination tenofovir 75 mg/kg/day, and dipyrindamole 25 mg/kg/day ($n = 10$ each). A daily injection of tenofovir s.c. and dipyrindamole i.p. was given for 4 weeks. Mice were weighed weekly. Double labeling of bone with calcein/Alizarin Red (7 and

3 days before sacrifice, respectively) was performed. Water and food were given ad libitum until euthanization. Animals were euthanized after 4 weeks in a CO₂ chamber. The long bones were removed, fixed, and prepared for μ CT and histological staining. Blood was collected at the time of euthanization and serum phosphorous was analyzed using the ADVIA 2400 chemistry analyzer (Siemens Healthcare S.L.U, Madrid, Spain) and following standard protocols ($n = 5$ each treatment).

Female C57Bl/6 mice were given an ovariectomy (OVX) or a sham procedure in which the ovaries were exteriorized, but not removed. OVX mice were divided into four groups: saline 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/day, dipyrindamole 25 mg/kg/day, combination tenofovir 75 mg/kg/day, and dipyrindamole 25 mg/kg/day ($n = 10$ each). A daily injection of tenofovir s.c. and dipyrindamole i.p. was given for 5 weeks. Mice were weighed weekly. Water and food were given ad libitum until euthanization. Animals were euthanized after 4 weeks in a CO₂ chamber. The long bones were removed, fixed, and prepared for μ CT and histological staining.

Measurement of bone mineral density

We assessed BMD (g/cm²) of whole skeletons by PIXImus bone densitometer (Lunar, Madison, WI, USA). The instrument was calibrated before each scanning session, using a phantom with known BMD, according to the manufacturer's guidelines. Mice were anesthetized by ketamin/xylacin anesthesia and placed in the prone position on the specimen tray for scanning of the entire skeleton.

Micro-X-ray computed tomography analysis

After sacrifice, long bones ($n = 10$ each treatment) were fixed in 70% ethanol and prepared for high-resolution μ CT as previously described.⁽²¹⁾ Briefly, analyses were performed in Skyscan 1172 μ CT (Bruker, WI, USA) using the following imaging parameters: 60 kV, 167 μ A, 9.7 micron pixel size, 2000 \times 1332 matrix, 0.3-degree rotation steps, six averages, movement correction of 10, 0.5-mm Al filter. Images were reconstructed using the Skyscan NRECON software (histogram range 0 to 0.085, beam-hardening correction of 40, Gaussian smoothing (factor 1), ring artifact correction of 8). For qualitative analysis, 3-D images midself were then reconstructed from the cross-sectional slices using CTNa and CTvox software provided by Skyscan.

Histomorphometry

Long bones ($n = 5$ each treatment) were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and after incubation in 15% and 30% sucrose consecutively, embedded in NEG medium, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA, and frozen in a dry ice-chilled isopentane bath. Ten- μ m sections of the nondecalcified bones were prepared using a tape-transfer method, thawed to room temperature, and stained with toluidine blue or for TRAP activity. Images were obtained with either a Nikon Eclipse fluorescence microscope or a Leica SCN 4000 whole-slide scanner (Leica, Wetzlar, Germany). Using BIOQUANT Osteo software (BIOQUANT Image Analysis, Nashville, TN, USA) analysis, a ROI was drawn interactively for each histological section, which was subsequently used in all the histomorphometric measurements.

Histological studies

Long bones were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, followed by decalcification in 10% EDTA for 4 weeks and paraffin embedding ($n = 5$ per treatment). Sections (5 μ m) were done.

TRAP staining was carried out in paraffin sections with a homemade TRAP buffer (0.1M acetate buffer, 0.3M sodium tartrate 10 mg/mL naphthol AS-MX phosphate, 0.1% Triton X-100, and 0.3 mg/mL fast red violet LB: all from Sigma-Aldrich). After deparaffinization and acetate buffer washing processes, samples were incubated in TRAP buffer for 30 min and counterstained with fast green stain.

Tricomic staining was performed in calcified tissue using standard protocols.

Immunohistochemistry analysis was carried out as previously described.⁽¹⁴⁾ Briefly, deparaffinized and hydrated sections were incubated with proteinase K solution (20 μ g/mL in TE buffer, pH 8.0) for 15 min in water bath at 37 °C for antigen retrieval. After blocking of nonspecific binding with PBS 3% BSA and 0.1% Triton X-100 for 1 hour, primary antibodies anti-cathepsin K, CD68, RANKL, OPG, alkaline phosphatase (ALP), collagens I and III, and sclerostin 1:200 were incubated overnight at 4 °C in a humidifying chamber. Secondary antibodies (goat anti-rabbit FITC 1:200, goat anti-mouse FITC 1:200) were incubated for 1 hour in the dark. Slides were mounted with Fluoroshield with DAPI mounting media (Sigma-Aldrich). Images were observed under fluorescence microscope (Nikon) equipped with Act1 software.

Statistical analysis

Statistical significance for differences between groups was determined by use of one-way ANOVA and Bonferroni post hoc test or Student's *t* test, as appropriate. All statistics were calculated using GraphPad software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

Tenofovir enhances osteoclast differentiation by an ATP transport-related mechanism and diminishes osteoblast differentiation. Its effects are reversed by dipyrindamole and adenosine A_{2A} receptor.

To determine whether tenofovir directly affects osteoclast differentiation and function, murine primary BMCs were isolated and osteoclasts were differentiated in tenofovir alone. Tenofovir produced a dose-dependent increase in osteoclast differentiation (EC₅₀ = 44.5nM; Fig. 1A). Because we had previously shown that tenofovir treatment diminishes extracellular adenosine levels by inhibiting ATP export via pannexin-1,⁽¹⁰⁾ we next determined whether increasing extracellular adenosine levels by treatment with dipyrindamole reversed the effect of tenofovir on osteoclast formation and found that dipyrindamole completely reversed the effect of tenofovir on osteoclast differentiation (IC₅₀ = 0.3 μ M; Fig. 1A).

To further confirm that indirect activation of A_{2A} receptor by dipyrindamole mediates the effect of tenofovir on osteoclast differentiation, precursors were collected during the 7 days of osteoclast differentiation and RNA was extracted. We observed that tenofovir modestly increased cathepsin K expression (up to a 73-fold change on day 7) when compared with RANKL alone (66-fold change; $p = ns$; Fig. 1B). Treatment with dipyrindamole decreased cathepsin K expression at late time points (27-fold at day 3 and 3.6-fold at day 7; $p < 0.001$); similar results were seen in the presence of tenofovir (Fig. 1B). In contrast, tenofovir increased NFATc1 expression (18-fold change at day 7) when compared with RANKL (9-fold, $p < 0.05$), and as described for cathepsin K, dipyrindamole decreased the expression alone and

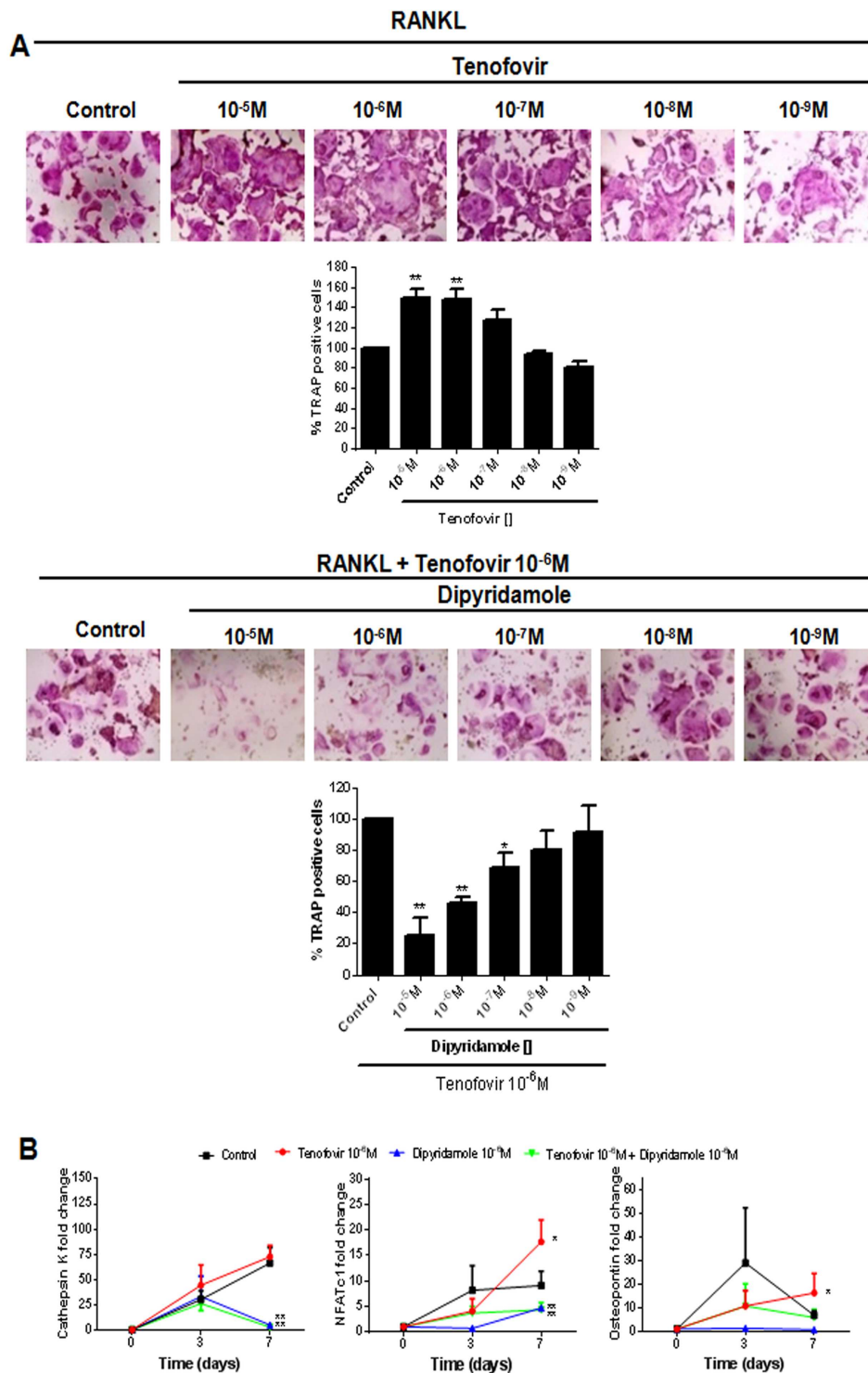


Fig. 1. Tenofovir enhances osteoclast differentiation in an adenosine triphosphate transport-related mechanism, and its effect is reversed by dipyridamole. (A) Murine-derived osteoclasts were fixed and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) after being cultured in the presence of tenofovir (10 μ M to 1nM) alone or in combination with dipyridamole (10 μ M to 1nM). TRAP-positive cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. The results are expressed as the means of five different assays carried out in duplicate. (B) Changes in cathepsin K, NFATc1, and osteopontin mRNA during the osteoclast differentiation process in the presence of tenofovir 1 μ M alone or with dipyridamole 1 μ M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ compared to control (ANOVA).

in the presence of tenofovir (4-fold, $p < 0.001$; Fig. 1B). Finally, mRNA expression for osteopontin was also upregulated in the presence of tenofovir after 7 days of incubation (16-fold versus 7-fold for RANKL; $p < 0.05$). Dipyridamole prevented the increase

in osteopontin mRNA expression and partially reversed the tenofovir-induced increase (six-fold change; Fig. 1B).

To probe the mechanism by which tenofovir affected osteoclast differentiation, we knocked down expression of

pannexin-1, connexin-43, and A2AR. As shown in Fig. 2A, tenofovir did not increase OC number when either pannexin-1 or connexin-43 was knocked down ($n=3$). Morphometric measurement of toluidine blue-stained dentin demonstrated a marked reduction in pit formation in tenofovir-treated osteoclasts when pannexin-1 or connexin-43 were knocked down, but not when A2AR was silenced (Fig. 2B). In contrast, dipyrindamole reversed the effect of tenofovir on pit formation in control and scrambled shRNA-infected cells, but not in A2AR knockdown cells (Fig. 2B).

Finally, to understand if tenofovir affected only osteoclast differentiation or had an effect on osteoblast formation, we treated stromal cells with tenofovir alone or with dipyrindamole; osteoblast differentiation was studied by Alizarin Red staining. We observed that tenofovir inhibited osteoblast differentiation in a dose-dependent manner ($IC_{50}=0.4 \mu\text{M}$) and that treatment with dipyrindamole reversed this effect ($EC_{50}=10\text{nM}$; Supplemental Fig. S1A). Moreover, our data indicated that tenofovir increases RANKL mRNA expression and decreases OPG mRNA expression during osteoblast differentiation, but that these effects are reversed by dipyrindamole (Supplemental Fig. S1B). Activation of β -catenin is essential for osteoblast differentiation and function. Therefore, we studied if this pathway was modified by tenofovir treatment (Supplemental Fig. S2). As observed by Western blot staining (Supplemental Fig. S2A) and immunostaining (Supplemental Fig. S2B), both total β -catenin and dephospho β -catenin (active) were increased in the cytoplasmic fraction and decreased in the nuclear fraction 15 min after treatment with tenofovir; this was reversed in the presence of dipyrindamole.

Tenofovir activates ERK1/2, p38, and NF κ B nuclear translocation during osteoclast differentiation and dipyrindamole reverses this effect

Activation of both MAPK and NF κ B are essential signals for osteoclast differentiation; we have previously shown that A2AR activation reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NF κ B nuclear translocation.⁽¹³⁾ Therefore, we examined the effect of tenofovir and dipyrindamole on the intracellular signaling mechanisms for osteoclast differentiation.

Following treatment with RANKL (control), we observed, as expected, an increase in ERK1/2 phosphorylation and tenofovir treatment enhances this effect ($30 \pm 9\%$ increased from basal versus $19 \pm 7\%$ increased from basal for RANKL, $p < 0.05$; Fig. 3A). Dipyrindamole prevents the tenofovir-mediated increase in ERK1/2 phosphorylation ($p < 0.001$ versus tenofovir alone; Fig. 3A). Similar results were observed for p38 phosphorylation (Fig. 3A). In contrast, neither tenofovir nor dipyrindamole—nor their combination—affected RANKL-induced JNK phosphorylation (Fig. 3A).

Activation and translocation of NF κ B to the nucleus is a critical signaling step during osteoclast differentiation, so we analyzed the effect of tenofovir and dipyrindamole on activation/translocation of NF κ B. We observed a rapid decrease (10 min) in cytoplasmic p50/p105 NF κ B when cells were treated with tenofovir ($58 \pm 5\%$ decreased versus basal, $P < 0.001$), which was slightly greater than the effect of RANKL alone ($46 \pm 12\%$ decreased versus basal, $P < 0.05$; Fig. 3B); pretreatment with dipyrindamole reversed the effect of RANKL on cytosolic p50/105 levels whether or not tenofovir was present ($29 \pm 10\%$ increased over baseline, $p < 0.0001$, versus tenofovir). Stimulation with

RANKL increased nuclear p50/105 levels similarly after treatment with medium alone or tenofovir ($241 \pm 34\%$ of basal for RANKL alone versus $181 \pm 25\%$ increased for tenofovir, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively, versus basal) and dipyrindamole reversed the effect of RANKL alone on p50/105 levels in the nucleus whether or not cells were treated with tenofovir ($5 \pm 28\%$ decreased, $p < 0.005$, versus tenofovir; Fig. 3B). All these changes are consistent with the decrease in cellular I κ B alpha ($68 \pm 6\%$ decreased for RANKL alone versus $63 \pm 8\%$ decreased in the presence of tenofovir, $p < 0.001$) and an increase in phosphoI κ B alpha ($180 \pm 22\%$ increased in the presence of RANKL and $210 \pm 14\%$ increased after treatment with tenofovir, $p < 0.05$, versus basal) and dipyrindamole reversed the effect of RANKL whether or not tenofovir was present ($p < 0.05$; Fig. 3B).

Tenofovir is taken up by cells and phosphorylated; tenofovir polyphosphates accumulate within the cell and mediate the effects of tenofovir on HIV reverse transcriptase and on ATP release. To determine whether cellular uptake and metabolism are required for the effect of tenofovir on NF κ B signaling, we determined changes in cytosolic and nuclear p50/105 levels after cells were pretreated with tenofovir for 30 min. Interestingly, dipyrindamole did not reverse the changes in levels of these proteins in cells that had been pretreated with tenofovir. These results are consistent with the hypothesis that intracellular tenofovir polyphosphates mediate the effects of tenofovir and that the blockade of adenosine uptake by dipyrindamole does not influence activation of NF κ B in osteoclast precursors in which transport of ATP, the precursor of adenosine, is blocked by tenofovir (Fig. 4A, B).

Tenofovir treatment induces weight loss, decreases bone mineral density, and reduces body fat in wild-type mice

As described above, tenofovir enhances osteoclast differentiation; thus, we postulated that tenofovir might induce osteopenia by enhancing bone turnover and reducing bone formation. Therefore, we treated mice with tenofovir or dipyrindamole, or their combination. We observed that mice treated with tenofovir 75 mg/kg/day lost nearly 10% of body weight ($p < 0.001$); however, this was recovered when mice were treated with tenofovir in combination with dipyrindamole 25 mg/kg/day (Fig. 5A). Whole-body DXA further demonstrated that tenofovir-treated mice had 18% less body fat by weight ($p < 0.05$) and a significant reduction in % body fat composition ($p < 0.05$); dipyrindamole corrected both of these conditions (Fig. 5B). DXA scanning also revealed a decrease in BMD when mice were treated with tenofovir ($0.045 \pm 0.001 \text{ g/cm}^2$ versus $0.049 \pm 0.0004 \text{ g/cm}^2$ for control, $p < 0.05$; Fig. 5C), and cotreatment with dipyrindamole reversed the change in BMD. Similar results were obtained for bone mineral content; Fig. 5C).

Histomorphometric analysis showed a decrease of bone mass in tenofovir-treated mice; the effect is reversed by dipyrindamole

To determine the nature of the bone loss we studied the long bones of the mice by μCT . As shown in Fig. 6A and Table 1, both cortical and trabecular bone were diminished in the tenofovir-treated mice, although the change was greater in trabecular bone. Moreover, dipyrindamole treatment reversed the effect of tenofovir on bone loss. Tenofovir reduced total bone volume (TV) and the ratio of bone volume/total volume (BV/TV; $p < 0.05$) and treatment with dipyrindamole reversed the effect (Fig. 6A, Table 1). μCT further revealed that tenofovir-treated mice had

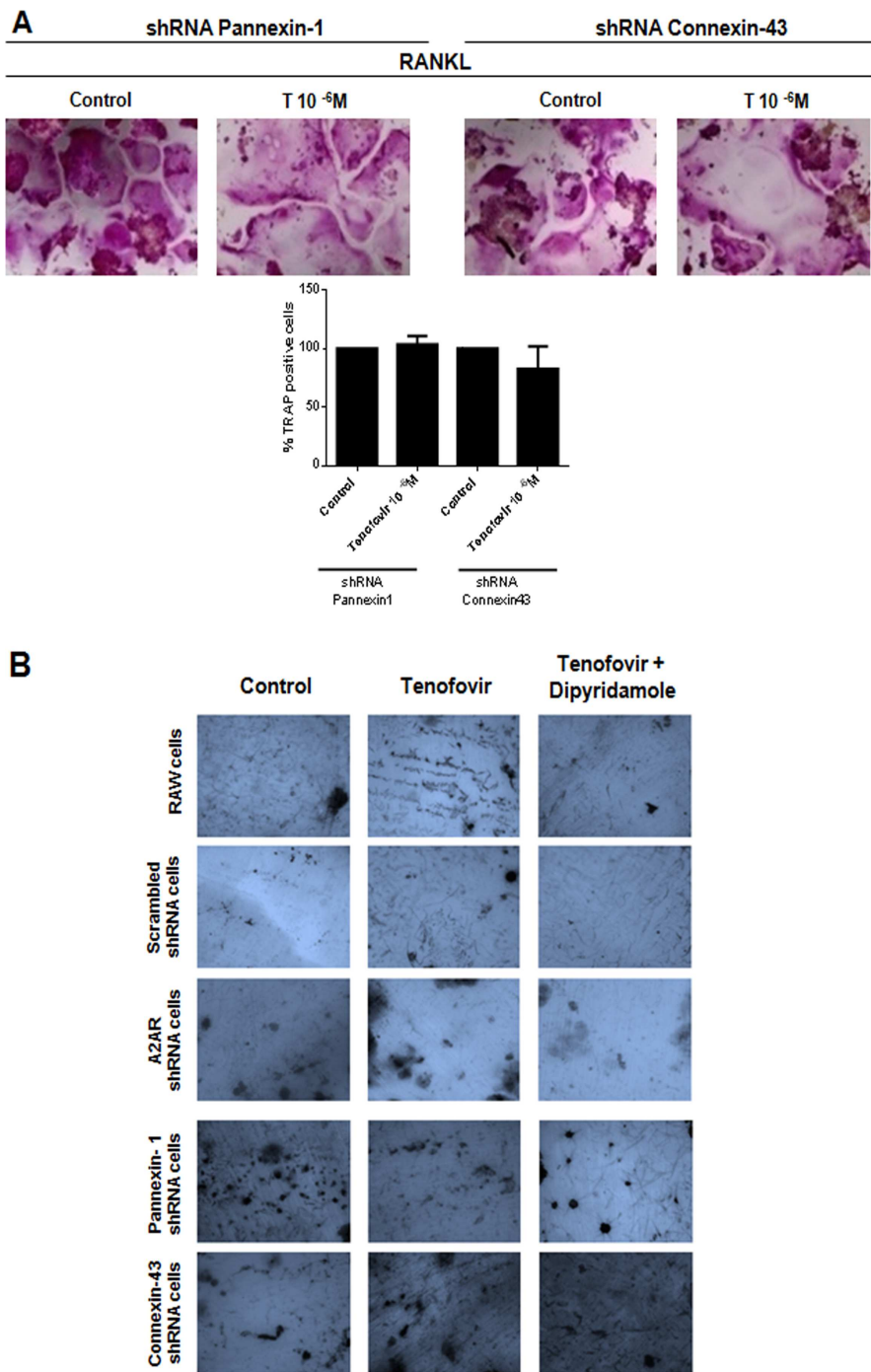


Fig. 2. Tenofovir enhances RAW264.7 differentiation in an adenosine triphosphate transport-related mechanism by pannexin-1 and connexin-43 and its effect is reversed by dipyridamole. (A) Pannexin-1 and connexin-43 silenced RAW264.7-derived osteoclasts were fixed and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) after being cultured in the presence of tenofovir 1 μ M. TRAP-positive cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. The results are expressed as the means of three different assays carried out in duplicate. (B) RAW264.7 cells were stably transduced with scrambled pannexin-1 and connexin-43 or EPAC1 and EPAC2 shRNA and treated with 50 ng/mL RANKL. Toluidine blue staining was performed to assay osteoclast activity.

diminished trabecular bone ($p < 0.0001$), BV ($p < 0.005$), BV/TV ($p < 0.005$), trabecular space (Tb. Sp; $p < 0.05$), trabecular number (Tb. N; $p < 0.005$), and BMD ($p < 0.05$) when compared with control mice (Table 1); cotreatment with dipyridamole reversed all of these changes.

Interestingly, tenofovir reduced bone formation in vivo (19 ± 2 - μ m bone apposition versus 35 ± 4 μ m in control mice, $p < 0.05$) and this effect was partially reversed in the presence of dipyridamole (30 ± 3 μ m, $p < 0.05$ versus tenofovir alone; Fig. 6B).

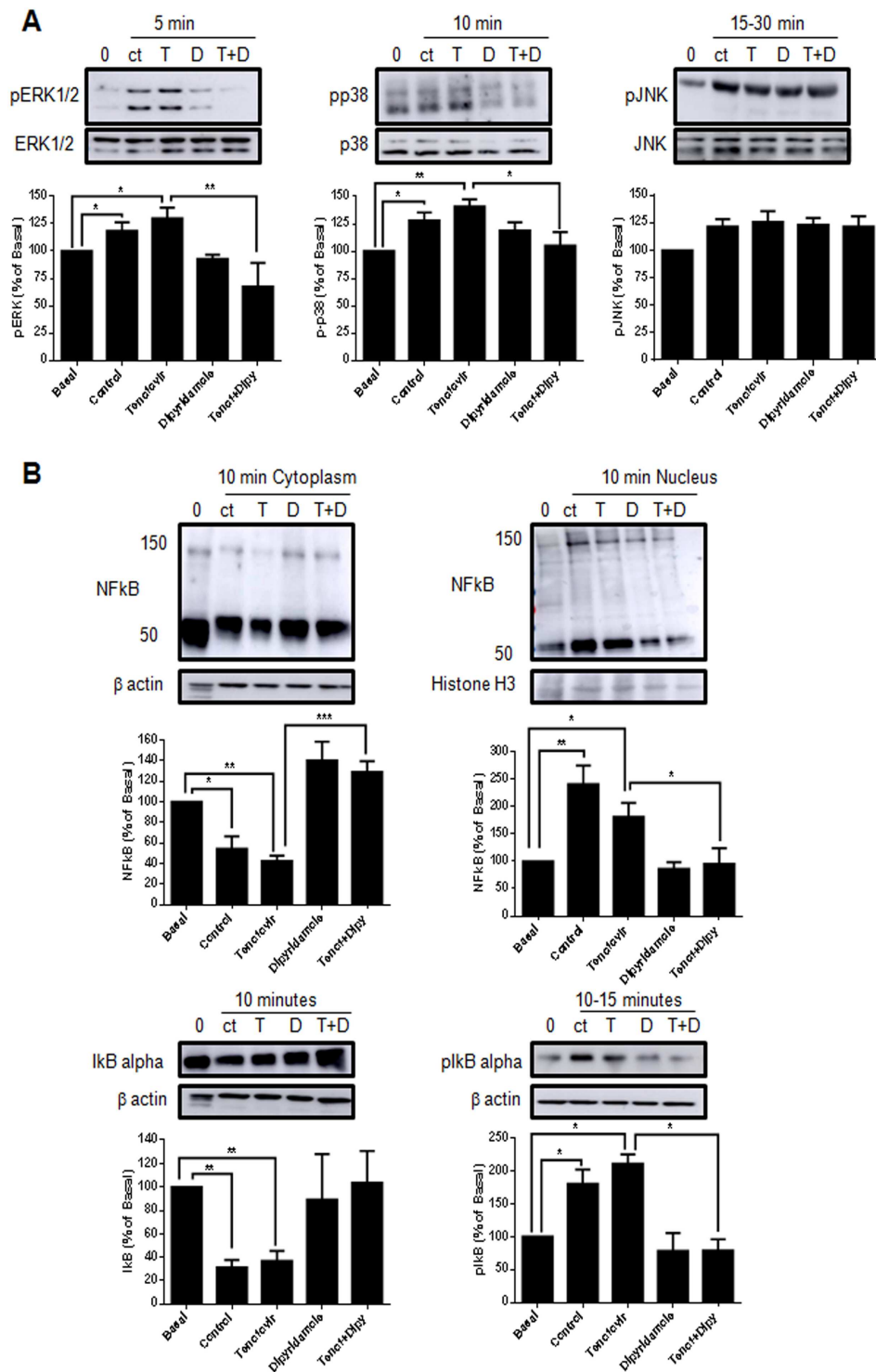


Fig. 3. Dipyridamole pretreatment reverses ERK1/2 and p38 phosphorylation and NF κ B nuclear translocation induced by tenofovir during osteoclast differentiation. (A) MAPKs were studied during osteoclast differentiation (5 to 30 min stimulation) in the presence of tenofovir 1 μ M alone or with dipyridamole 1 μ M. To normalize for protein loading, the membranes were reprobbed with ERK2, p38, or JNK, respectively, and results normalized appropriately. (B) NF κ B p50/p105 nuclear translocation, I κ B α and p-I κ B α were studied in the presence of tenofovir 1 μ M alone or in the presence of dipyridamole 1 μ M. The results shown represent the the means (\pm SEM) of five independent experiments. *** p < 0.0001, ** p < 0.005, * p < 0.5 versus nonstimulated control (ANOVA).

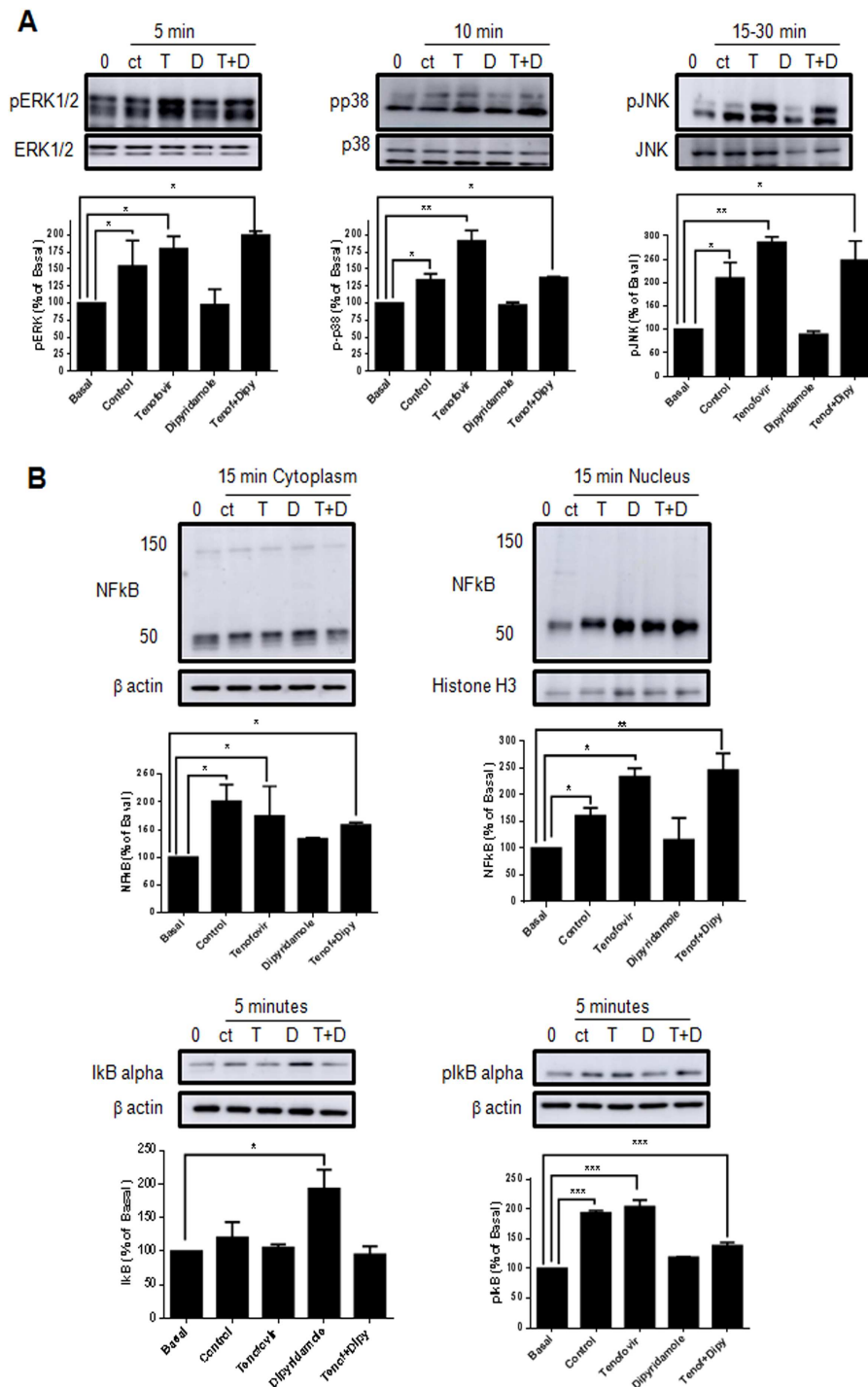


Fig. 4. Tenofovir pretreatment activates ERK1/2, p38, and NFκB nuclear translocation during osteoclast differentiation; dipyrindamole does not reverse this effect. (A) MAPKs were studied during osteoclast differentiation (5- to 30-min stimulation) in the presence of tenofovir 1 μM alone or with dipyrindamole 1 μM. To normalize for protein loading, the membranes were reprobbed with ERK2, p38, or JNK, respectively, and results normalized appropriately. (B) NFκB p50/p105 nuclear translocation, IκBα and p-IκBα were studied in the presence of tenofovir of 1 μM alone or with dipyrindamole 1 μM. The results shown represent the means (±SEM) of five independent experiments. ****p* < 0.0001, ***p* < 0.005, **p* < 0.5 versus nonstimulated control (ANOVA).

Histological examination indicated that there was an increase in TRAP-positive osteoclasts in the femoral metaphysis of tenofovir-treated mice (83 ± 31 versus 27 ± 1 OC/high power field [hpf]) in control mice, *p* < 0.05). This increase was reversed

when mice were treated with dipyrindamole (30 ± 2 OC/hpf, *p* < 0.005 versus tenofovir alone; Fig. 6C).

Immunofluorescence showed similar results when osteoclasts were identified by immunohistological staining for cathepsin K

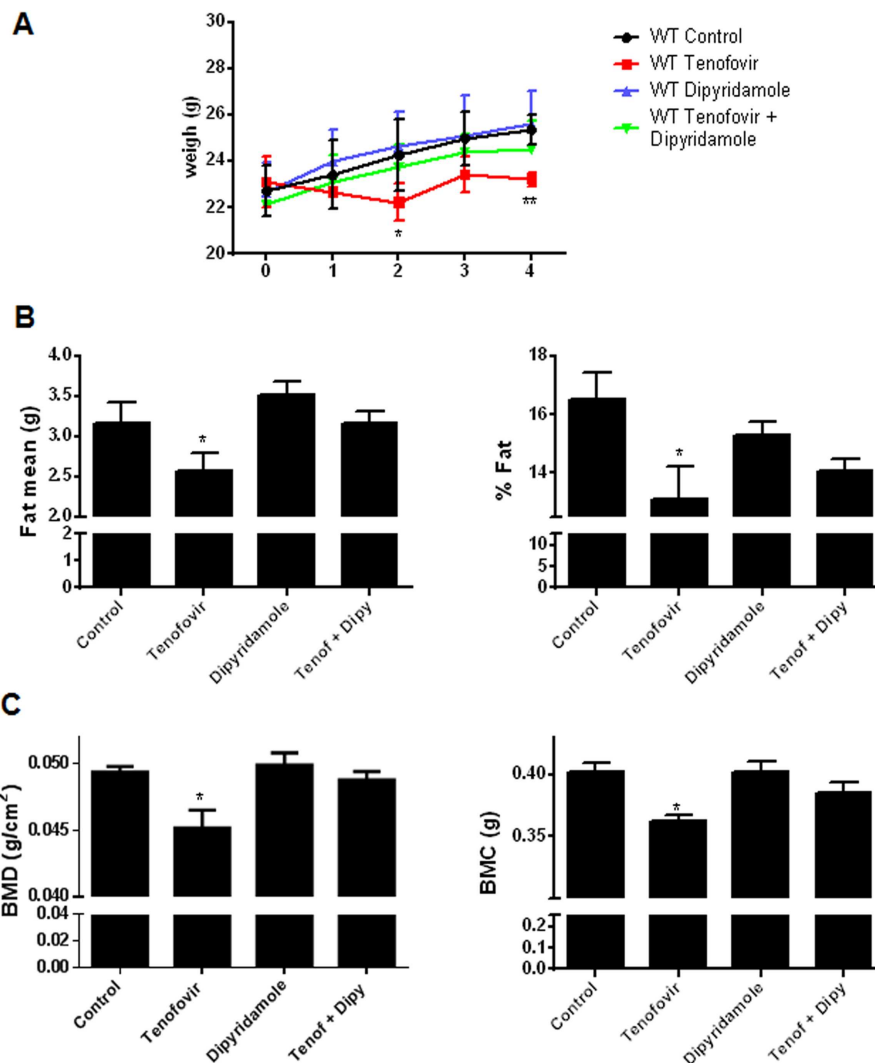


Fig. 5. Tenofovir induces weight loss, decreases BMD, and promotes body fat reduction in WT mice. Male C57Bl/6 mice were divided into four groups: saline 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/day, dipyrnidamole 25 mg/kg/day, combination tenofovir 75 mg/kg/day, and dipyrnidamole 25 mg/kg/day for 4 weeks. (A) Weight was measured weekly. (B) DXA scanning was performed and fat mean (g) and % body fat analyzed in all groups. (C) DXA scanning was performed and BMD (g/cm^2) and Bone Mineral Content (g) were analyzed in all groups. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.005$, * $p < 0.5$ versus control (ANOVA).

(Fig. 7). Macrophages (CD68+ cells) followed a similar trend with an increase in tenofovir treatment and a decrease when mice were treated with dipyrnidamole (Fig. 7). RANKL-positive cells were increased in the presence of tenofovir, whereas OPG-positive cells decreased; both effects were reversed in the presence of dipyrnidamole (Fig. 7). Surprisingly, ALP-positive cells did not change with any treatment (Fig. 7), suggesting that the decrease in bone density and volume resulted from increased bone resorption. As osteoblasts form the periosteal and endosteal lining of the bone, we analyzed the content of collagens I and III to look for differences among treatments in this lining. As observed in Fig. 7, no changes were found in collagens I or III with any treatment. Sclerostin-expressing osteocytes were increased in the bone of tenofovir-treated mice and dipyrnidamole reversed this change (Fig. 7).

To corroborate μ CT and histology results, histomorphometric analysis in frozen undecalcified samples was performed. Using

BIOQUANT Osteo software, changes in BV, TV, BV/TV, Tb. N, Tb. Sp, osteoblast number (Ob. N), and osteoclast number (Oc. N), as well as the number of cells per surface (Ob. N/BS, Oc. N/BS) were calculated (Table 2). We found a significant decrease in BV, BV/TV, Tb. N, Ob. N/BS, a nonsignificant decrease in Ob. N, and a significant increase in Oc. N and surface (Oc. N/BS) in tenofovir-treated mice. Dipyrnidamole treatment reversed all of these changes (Table 2).

Moreover, as the most common effect of tenofovir on mineral metabolism in humans is hypophosphatemia, which can lead to osteomalacia, we measured phosphorous levels in serum in our treated mice. As shown in Supplemental Fig. S3A, no significant changes in phosphorous were found in tenofovir-treated mice, in dipyrnidamole-treated mice, or in the combination of the two. Moreover, we studied the osteoid thickness under double trichromic staining (Supplemental Fig. S3B); we did not find any differences in thickness in any of the treated animals when

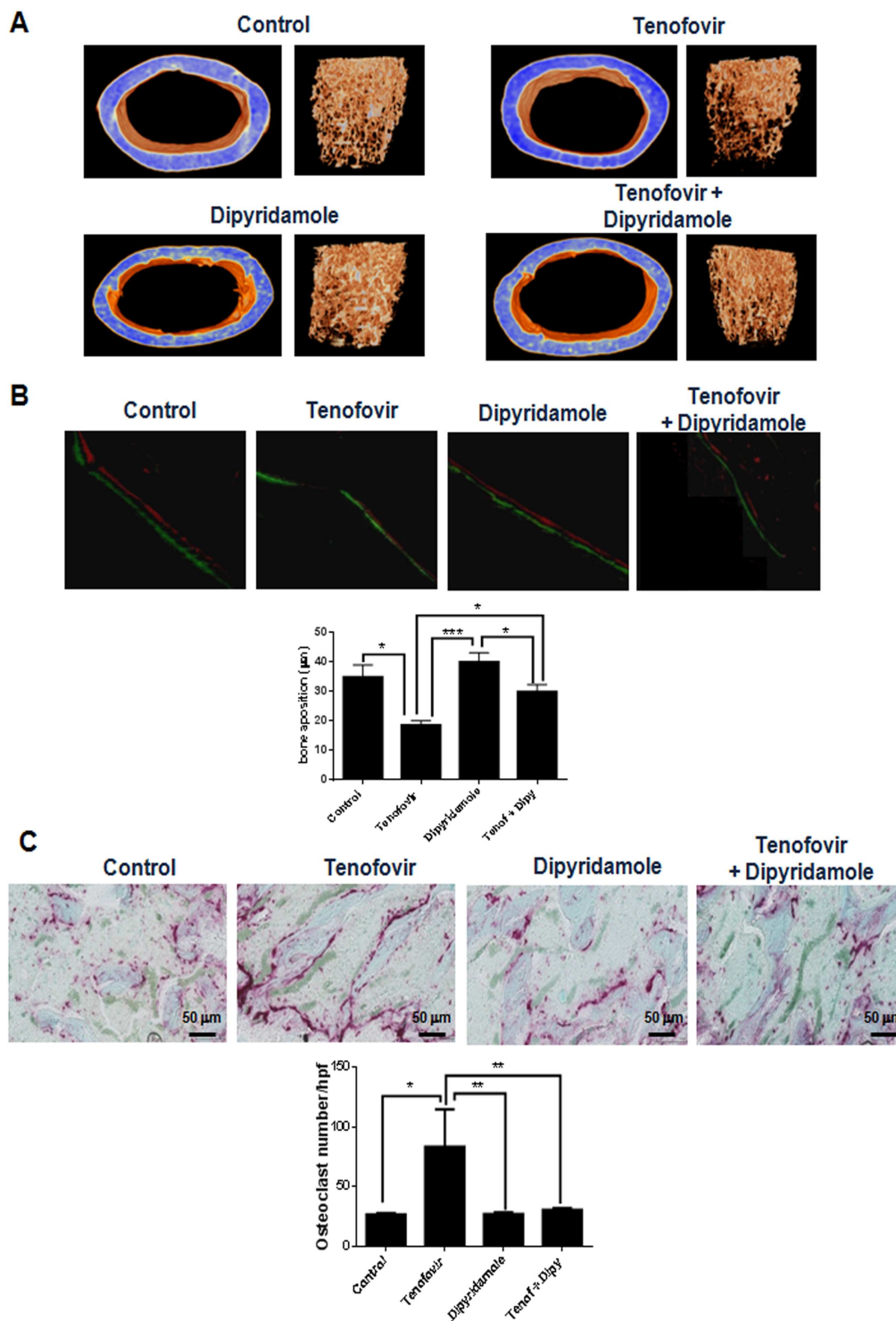


Fig. 6. Dipyridamole reverses the effect of tenofovir in bone in vivo. Male C57Bl/6 mice were divided into four groups: saline 0.9% (control), tenofovir 75 mg/kg/day, dipyridamole 25mg/kg/day, combination tenofovir 75 mg/kg/day, and dipyridamole 25 mg/kg/day for 4 weeks. (A) The figures show representative μ CT images of cortical and trabecular bone in femur midshaft. (B) Fluorescence microscopic images showing double-labeling by calcein-Alizarin Red after treatments. The graph indicates the mean mineral apposition rate in μ m. Images were taken at $400\times$ magnification. Data are expressed as mean \pm SEM. $**p < 0.005$, $*p < 0.05$ versus control (ANOVA). (C) Shown are representative images for tartrate-resistant acid phosphatase staining for osteoclasts in mice femur and the mean (\pm SEM, $n = 5$ mice per group) number of osteoclasts/hpf. Images were taken at $\times 400$ magnification. Scale bar indicates 50 μ m. $*p < 0.05$, $**p < 0.005$ $***p < 0.0001$ compared with control (ANOVA).

Table 1. μ CT Analysis of Long Bones Treated With Tenofovir, Dipyridamole, or a Combination

Cortical bone	Control	Tenofovir	Dipyridamole	Tenofovir + dipyridamole
TV (mm ³)	1.21 ± 0.03	1.07 ± 0.02*	1.2 ± 0.04	1.19 ± 0.03
BV (mm ³)	0.5 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.01
BV/TV	45.39 ± 0.35	42.16 ± 0.17*	43.53 ± 0.52	41.29 ± 0.61
BMD (g/cm ³)	1.2 ± 0.01	1.02 ± 0.14	1.24 ± 0.005	1.24 ± 0.01
Trabecular bone	Control	Tenofovir	Dipyridamole	Tenofovir + dipyridamole
TV (mm ³)	5.09 ± 0.1	4.38 ± 0.08***	5.47 ± 0.1	5.75 ± 0.19
BV (mm ³)	0.69 ± 0.07	0.41 ± 0.03**	0.6 ± 0.06	0.56 ± 0.03
BV/TV	12.97 ± 1.26	8.79 ± 0.45**	12.74 ± 1.33	10.84 ± 0.51
Tb. Th	0.055 ± 0.002	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.002	0.045 ± 0.002
Tb. Sp	0.2 ± 0.004	0.24 ± 0.003*	0.21 ± 0.006	0.23 ± 0.004
Tb. N	2.5 ± 0.13	1.75 ± 0.07**	2.44 ± 0.11	2.31 ± 0.08
BMD (g/cm ³)	0.76 ± 0.01	0.68 ± 0.01**	0.8 ± 0.02	0.83 ± 0.01

μ CT analysis of both cortical and trabecular bones using Skyscan 1172 μ CT (mean ± SEM, $n = 10$ per group).

TV = total bone volume; BV = bone volume; BV/TV = bone volume/total volume; BMD = bone mineral density; Tb. Th = trabecular thickness; Tb. Sp = trabecular space; Tb. N = trabecular number.

* $p < 0.05$. ** $p < 0.005$. *** $p < 0.001$ versus wild type (ANOVA).

compared with control mice, which indicates that our mice did not suffer from osteomalacia.

Finally, as sex steroids can interact in bone homeostasis, we studied the effect of tenofovir in female OVX mice. As shown in Supplemental Fig. 4SA, we observed that, as happened with males, female mice treated with tenofovir 75 mg/kg/day lost approximately 8% of body weight ($p < 0.001$). This was recovered when mice were treated with tenofovir in combination with dipyridamole 25 mg/kg/day. DXA analysis further showed that tenofovir-treated mice had less body fat by weight when compared with OVX control mice; dipyridamole corrected this (Supplemental Fig. S4A). DXA scanning also revealed a decrease in BMD and BMCs when mice were treated with tenofovir; cotreatment with dipyridamole reversed these changes (Supplemental Fig. S4A). μ CT analysis showed similar changes in trabecular bone as the ones seen for male littermates (Supplemental Fig. S4B). Cathepsin K immunostaining showed an increase in osteoclasts caused by the tenofovir treatment that was reversed in the presence of dipyridamole. ALP-positive cells did not change with any treatment as was found in male mice (Supplemental Fig. S5).

Discussion

We have shown that tenofovir, an agent that inhibits ATP release and thereby diminishes extracellular ATP and adenosine levels, increases osteoclast and osteoblast differentiation in vitro, increases the number of osteoclasts in bone in vivo, reduces bone production and bone volume, and inhibits bone formation in vivo. Moreover, treatment with tenofovir also increases the number of sclerostin+ osteocytes without affecting the number of osteoblasts in vivo. These findings are all reversed by dipyridamole, an agent whose effect in bone has clearly been shown to depend on intact adenosine A2A receptor signaling.⁽²²⁾ Importantly, these studies could suggest a reasonable clinical approach to preventing the development of osteopenia in patients taking tenofovir as part of their ART.

Rates of osteoporosis and fragility fractures are higher in the HIV-infected population than in uninfected individuals; this cannot be completely explained by differences in traditional risk

factors.⁽²³⁾ Both HIV infection itself and some ARTs increase osteopenia risk in an independent manner as shown in randomized controlled trials and observational studies.⁽²⁴⁾ Tenofovir disoproxil fumarate (TDF)/emtricitabine has been the main nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor use in combination ART for more than a decade. TDF has previously been noted to increase the risk of fragility fractures.^(25,26) Here we described how tenofovir enhances osteoclast differentiation by an adenosine-dependent mechanism, which suggests that treatment with agents that increase local adenosine concentrations, like dipyridamole, might prevent bone loss following tenofovir treatment both in vitro and in vivo.

The main limitation to our study was the absence of HIV in our animal model. Another limitation was the relatively short time of treatment (4 weeks), which may not reflect long-term exposure to tenofovir.

Nevertheless, to our knowledge, this is one of the first studies addressing the pathway involved in the effect of tenofovir on osteoclast differentiation. Previously, Grigsby et al⁽²⁷⁾ described how exposure of primary osteoclasts to TDF 500nM resulted in a downregulation of three genes (*Snord32a*, *Gnas*, and *Got2*) leading to osteoclast dysfunction. One of the genes studied by Grigsby and colleagues,²⁷ *Gnas* (guanine nucleotide binding protein [α S]), activates cAMP-dependent pathways by stimulating the production of cAMP from ATP following stimulation of such receptors as the A2AR. According to the authors, this gene downregulation would result in downregulation of MAPK/ERK signaling and a reduction in osteoclasts and suggests that the bone-formation activity of osteoblasts may also be downregulated after TDF treatment so that an overall loss of bone density is observed.

It is well-described that in HIV-positive patients, osteoblasts are not infected by the virus; gp120 protein induces RANKL secretion and osteoblast proliferation, but not apoptosis.⁽²⁸⁾ In addition, it has been recently shown that TDF has a suppressive effect on primary human osteoblast mineralization by affecting type II and type III sodium-dependent phosphate transporters.⁽²⁹⁾ Our data indicate that tenofovir decreased osteoblast differentiation and function in vitro in a dose-dependent manner by a mechanism involving β -catenin signaling. This

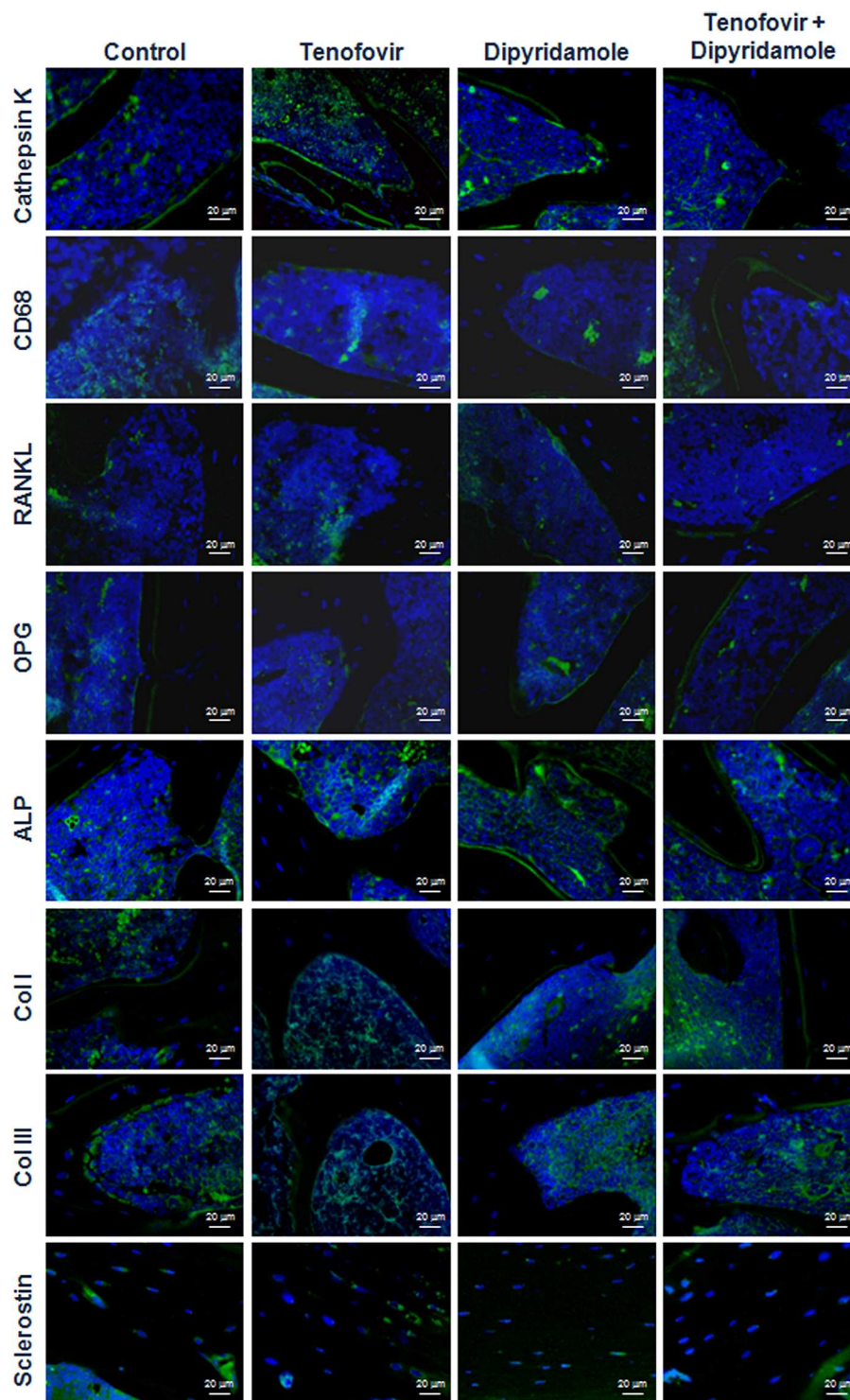


Fig. 7. Immunohistochemistry for markers of different bone cells. Long bones were processed and immunohistological staining carried out. Shown are representative images stained for cathepsin K, CD68, RANKL, osteoprotegerin, alkaline phosphatase, collagen I, collagen III, and sclerostin (green). Nuclei are shown in blue (Dapi). All images were taken at $\times 40$ magnification and scale bar indicates 20- μm segment.

might indicate a novel mechanism that contributes to tenofivir impairment of bone homeostasis, as we have previously demonstrated a crosstalk between adenosine A2AR and β -catenin.⁽³⁰⁾ Our data indicate also that osteoblast function is altered in the presence of tenofivir; meanwhile, we did not

observe any decline in osteoblast number in vivo. This might indicate that although the number of osteoblasts is not modified, their function is altered; therefore, mineralization is inhibited and bone formation is suppressed. It is possible that the enhancement in sclerostin-expressing osteocytes plays a

Table 2. Histomorphometric Measures of Long Bones Treated With Tenofovir, Dipyridamole, or a Combination

	Control	Tenofovir	Dipyridamole	Tenofovir + dipyridamole
BV (mm ³)	0.064 ± 0.010	0.031 ± 0.006*	0.048 ± 0.004	0.050 ± 0.003
TV (mm ³)	1.020 ± 0.001	1.020 ± 0.002	1.010 ± 0.005	1.040 ± 0.009
BV/TV	0.070 ± 0.008	0.030 ± 0.006**	0.050 ± 0.006	0.060 ± 0.004
Tb.N	12.040 ± 1.600	9.140 ± 2.300*	15.290 ± 0.600	16.600 ± 0.200
Tb.Sp (μm)	0.030 ± 0.0060	0.04 ± 0.005	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.004
Ob.N	41 ± 1	35 ± 2	43 ± 2	44 ± 3
Ob.N/BS	4.110 ± 0.240	2.410 ± 0.170**	4.510 ± 0.520	3.440 ± 0.280
Oc.N	32.000 ± 2.000	48 ± 2***	27 ± 1	31 ± 1
Oc.N/BS	2.77 ± 0.44	4.73 ± 0.43**	2.82 ± 0.13	2.42 ± 0.22

Histomorphometric measures on long bones were calculated using the BIOQUANT Osteo software (mean ± SEM, *n* = 5 per group).

p* < 0.05. *p* < 0.005. ****p* < 0.001 versus wild type (ANOVA).

BV = bone volume; TV = total bone volume; BV/TV = bone volume/total volume; Tb. N = trabecular number; Tb. Sp = trabecular separation; Ob. N = osteoblast number; Ob.N/BS = osteoblast surface; Oc.N = osteoclast number; Oc.N/BS = osteoclast surface.

role in the reduction of bone production that we found *in vivo*, but also appeared to reduce osteoblast production of new bone *in vivo*.

Tenofovir appears to enhance all signaling pathways involved in promoting osteoclast differentiation including activation of MAPK pathways and NFκB activation: signaling events that are reversed by dipyridamole treatment. Previously, we have found that direct activation of A2AR inhibits NFκB translocation to the nucleus and inhibits osteoclast differentiation by a mechanism that involves cAMP-PKA-ERK1/2 signaling,⁽¹³⁾ signals downstream of *Gnas*. Dipyridamole, which does not affect bone homeostasis in A2AR knockout mice, most likely reverses the effect of tenofovir by restoring extracellular adenosine levels that are reduced by tenofovir treatment.⁽¹⁰⁾

We recently demonstrated that tenofovir blocks pannexin-1-mediated cellular ATP release leading to diminished extracellular adenosine levels and diminished A2AR-mediated fibrosis in two murine models.⁽¹⁰⁾ Tenofovir is taken up by cells and converted to tenofovir polyphosphates, which mediate the antiviral effects of the agent. Although tenofovir itself is an analogue of AMP, it does not interfere with the activity of ecto-5′nucleotidase. In relation to our results, Velasquez and colleagues⁽³¹⁾ found that the binding of HIV to CD4 and CXCR4/CCR5 induces the opening of pannexin-1 hemichannels with the release of ATP. The extracellular ATP released binds to and activates P2 × 1 receptors causing calcium influx, which facilitates HIV entry and later stages of the HIV life cycle.⁽³¹⁾ Here we showed that, in the absence of pannexin-1, tenofovir did not affect osteoclast differentiation and function (Fig. 1). Taken together these results suggest the hypothesis that a blockade of pannexin-1 hemichannels by tenofovir phosphates could also contribute to the antiretroviral effects of the drug by blocking HIV entry into the cell.

Adenosine and its receptors are key mediators in osteoclast homeostasis. The adenosine A1 receptor (A1AR) is critical for osteoclast differentiation and function; a pharmacological blockade or deletion of the A1AR increases bone density and prevents ovariectomy-induced bone loss in mice.^(32–35) A2AR activation inhibits osteoclast differentiation and function and increases the percentage of immature osteoclast precursors, in part by decreasing IL-1β and TNFα secretion.⁽¹⁵⁾ The levels of extracellular adenosine differ in each tissue and in response to different levels of stress and to the basal stimulation of the receptor by the endogenous variations of the agonist.⁽¹²⁾

Decreased adenosine levels, resulting from tenofovir-mediated inhibition of ATP release via pannexin-1, likely explain the increase in osteoclast differentiation mediated by tenofovir and could contribute to the development of osteopenia in patients treated with tenofovir.

In a study of rats, a relatively short exposure to stavudine (nucleoside reverse transcriptase inhibitors) monotherapy and TDF significantly decreased femoral BMD; this translated to decreased bone strength.⁽³⁶⁾ This finding is similar to our finding that, even in the absence of HIV infection, tenofovir diminished BMD and trabecular bone. In this same rat study, Conradie and colleagues also observed that treatment with both stavudine and TDF resulted in significant marrow adiposity and suggested that osteoblast numbers may be depleted. We did not observe marrow adiposity or any change in osteoblast number, although we did observe diminished bone formation in the tenofovir-treated mice.

Moreover, a meta-analysis of 2210 patients suggested that changing the HIV regimen to TDF is associated with a reduction in BMD⁽³⁷⁾, and switching from TDF to tenofovir alafenamide (TAF) led to an improvement in BMD.^(38,39) A recent double-blind phase 3 trial of 1733 ART-naïve HIV-infected individuals found that a TAF-based regimen had better virologic efficacy and less impact on BMD compared with a TDF-based regimen formulated with similar antiretroviral agents.⁽⁴⁰⁾ For the moment, it is clear that TAF users had fewer signals of kidney injury compared with TDF users, and decreases in BMD were generally milder, although there is still a significant effect on BMD.

Finally, in our *in vivo* model with our settings, we have not seen signs of hypophosphatemia or osteomalacia (Supplemental Fig. S3). This is of interest as hypophosphatemia linked to a decreased proximal tubular reabsorption was frequently observed in tenofovir HIV-treated adults.⁽⁴¹⁾ At early points after the introduction of tenofovir treatment, no changes on phosphatemia and tubular phosphate reabsorption was observed.⁽⁴¹⁾ In a prospective observational study performed in different HIV individuals treated with and without tenofovir, it was found that the etiology of hypophosphatemia seems to be multifactorial and unrelated to tenofovir or renal dysfunction.⁽⁴²⁾ In relation to osteomalacia, Mateo and colleagues have reported 5 patients who developed hypophosphatemic osteomalacia under tenofovir treatment. All patients were under long-term tenofovir treatment.⁽⁴³⁾ This indicates that changes in phosphatemia and related osteomalacia need long-term treatments to

be developed. Our animal model is only a 4-week treatment. That might be the reason we did not see changes in phosphorous levels or osteomalacia.

We conclude that tenofovir exerts a direct effect on osteoclast differentiation and bone resorption, and that treatment with agents that increase local adenosine concentrations, like dipyridamole, might be useful in preventing bone loss following tenofovir treatment in HIV patients.

Disclosures

AM and BC have filed a patent on the use of adenosine A2AR agonists to prevent prosthesis loosening (pending) and a separate patent on the use of A2AR agonists and agents that increase adenosine levels to promote bone formation/regeneration. FMC and TW do not have any disclosures. PL-G has filed a patent on the use of lipocalin-2 as treatment in abdominal aortic aneurysm, RL and GH-B have filed a patent on the use of 6-shogaol in osteoarthritis. BN Cronstein has consulted for Eli Lilly & Co., Horizon Pharmaceuticals and AstraZeneca and has a grant from AstraZeneca. Dr. Cronstein is a founder and Director of the Scientific Advisory Board of Regenosine, Inc. and has equity in Regenosine, Inc.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III through the "Miguel Servet" program (CP15/00053), cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and a research grant from the Spanish Instituto de Salud Carlos III (PI16/). This work was supported by grants from the Arthritis Foundation, the NYU School of Medicine Applied Research Support Fund and the National Institutes of Health (R01 AR056672 and R01 AR068593) and by the NYU-HHC Clinical and Translational Science Institute (UL1 TR000038) by the Translational Research Laboratory Instruments at NYU-Langone Health. We want to thank Z. Dewan and C. Loomis from the NYU Histopathology Core (supported by Cancer Center Support Grant P30CA016087 at the Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center) for technical assistance and Drs. N. Dymant and D. Rowe at the University of Connecticut Health Center for advice on tissue preparation and sectioning. We want to acknowledge NIH grant for microCT, S10 OD010751.

Authors' roles: AM designed the experiments, analyzed, and interpreted the results, cowrote and revised the manuscript. FMC-B and PL-G were primarily responsible for carrying out all experimental procedures. AL-V performed the osteoid measurements. FMC-B cowrote the manuscript. TW assisted with animal treatments and revised the manuscript. BC designed experiments and edited the manuscript. RL and GH-B edited the manuscript.

References

1. Erlandson KM, Allshouse AA, Jankowski CM, et al. Functional impairment is associated with low bone and muscle mass among persons aging with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Jun;63(2):209–15.
2. Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*. 2006; 20(17):2165–74.
3. Cunha BM, Mota LM, Pileggi GS, Safe IP, Lacerda MV. HIV/AIDS and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2015;14(5):396–400.
4. Jiménez B, Sainz T, Díaz L, et al. Madrid cohort of HIV-infected children and adolescents integrated in the pediatric branch of the Spanish national AIDS research network (CoRISpe). Low bone mineral density in vertically HIV-infected children and adolescents: risk factors and the role of T-cell activation and senescence. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Jun;36(6):578–83.
5. Foca E, Motta D, Borderi M, et al. Prospective evaluation of bone markers, parathormone and 1,25-(OH)₂ vitamin D in HIV-positive patients after the initiation of tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir or efavirenz. *BMC Infect Dis*. 2012 Feb;12(1):38.
6. Guerri-Fernandez R, Lerma-Chippirraz E, Fernandez Marron A, et al. Bone density, microarchitecture and tissue quality after 1 year of treatment with tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS*. 2018 Apr;32(7):913–20.
7. Pinzone MR, Moreno S, Cacopardo B, Nunnari G. Is there enough evidence to use bisphosphonates in HIV-infected patients? A systematic review and meta-analysis. *AIDS Rev*. 2014;16(4):213–22.
8. Borderi M, Gibellini D, Vescini F, et al. Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS*. 2009;23(11):1297–310.
9. Brown TT, Ross AC, Storer N, Labbato D, McComsey GA. Bone turnover, osteoprotegerin/RANKL and inflammation with antiretroviral initiation: tenofovir versus non-tenofovir regimens. *Antivir Ther*. 2011;16(7):1063–72.
10. Feig JL, Mediero A, Corciulo C, et al. The antiviral drug tenofovir, an inhibitor of Pannexin-1-mediated ATP release, prevents liver and skin fibrosis by downregulating adenosine levels in the liver and skin. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188135.
11. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacological Rev*. 2011;63(1):1–34.
12. Jacobson KA, Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):247–64.
13. Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A(2A) receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NFκB nuclear translocation. *Br J Pharmacol*. 2013;169(6):1372–88.
14. Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, He W, Mazumder A, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor activation prevents wear particle-induced osteolysis. *Sci Transl Med*. 2012;4(135):135–65.
15. Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptor ligation inhibits osteoclast formation. *Am J Pathol*. 2012 Feb;180(2):775–86.
16. Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J*. 2015; 29(4):1577–90.
17. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*. 1999 Jul;25(1):109–13.
18. He W, Mazumder A, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine regulates bone metabolism via A1, A2A, and A2B receptors in bone marrow cells from normal humans and patients with multiple myeloma. *FASEB J*. 2013 Sep;27(9):3446–54.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May;29(9):e45.
20. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville, MD:U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 2005.
21. Mediero A, Wilder T, Ramkhalawon B, Moore KJ, Cronstein BN. Netrin-1 and its receptor Unc5b are novel targets for the treatment of inflammatory arthritis. *FASEB J*. 2016;30(11):3835–44.
22. Ishack S, Mediero A, Wilder T, Ricci JL, Cronstein BN. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds is enhanced by coating scaffolds with either dipyridamole or BMP-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Feb;105(2):366–75.

23. Cotter AG, Sabin CA, Simelane S, et al. Relative contribution of HIV infection, demographics and body mass index to bone mineral density. *AIDS*. 2014;28(14):2051–60.
24. Hileman CO LD, Storer NJ, Tangpricha V, McComsey GA. Is bone loss linked to chronic inflammation in antiretroviral-naive HIV-infected adults? A 48-week matched cohort study. *AIDS*. 2014;28(12):1759–67.
25. Stellbrink HJ, Orkin C, Arribas JR, et al. Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study. *Clin Infect Dis*. 2010;51(8):963–72.
26. Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *AIDS*. 2012;26(7):825–31.
27. Grigsby IF, Pham L, Gopalakrishnan R, Mansky LM, Mansky KC. Downregulation of Gnas, Got2 and Snord32a following tenofovir exposure of primary osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(3):1324–9.
28. Cummins NW, Klicpera A, Sainski AM, et al. Human immunodeficiency virus envelope protein Gp120 induces proliferation but not apoptosis in osteoblasts at physiologic concentrations. *PLoS One*. 2011;6(9):e24876.
29. Barbieri AM, Chiodini I, Ragni E, et al. Suppressive effects of tenofovir disoproxil fumarate, an antiretroviral prodrug, on mineralization and type II and type III sodium-dependent phosphate transporters expression in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2018; 119(6):4855–66.
30. Shaikh G, Zhang J, Perez-Aso M, Mediero A, Cronstein B. Adenosine A2A receptor promotes collagen type III synthesis via β -catenin activation in human dermal fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2016; 173(23):3279–91.
31. Velasquez S, Eugenin EA. Role of pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol* 2014;5:96.
32. He W, Cronstein BN. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal*. 2012;8(2):327–37.
33. Kara FM, Chitu V, Sloane J, et al. Adenosine A1 receptors (A1Rs) play a critical role in osteoclast formation and function. *FASEB J*. 2010; 24(7):2325–33.
34. Kara FM, Doty SB, Boskey A, et al. Adenosine A(1) receptors regulate bone resorption in mice: adenosine A(1) receptor blockade or deletion increases bone density and prevents ovariectomy-induced bone loss in adenosine A(1) receptor-knockout mice. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):534–41.
35. He W, Wilder T, Cronstein BN. Rolofylline, an adenosine A1 receptor antagonist, inhibits osteoclast differentiation as an inverse agonist. *Br J Pharmacol*. 2013;170(6):1167–76.
36. Conradie MM, van de Vyver M, Andrag E, Conradie M, Ferris WF. A direct comparison of the effects of the antiretroviral drugs stavudine, tenofovir and the combination lopinavir/ritonavir on bone metabolism in a rat model. *Calcif Tissue Int*. 2017; 101(4):422–32.
37. Ewald H, Santini-Oliveira M, Bühler JE, et al. Comparative effectiveness of tenofovir in HIV-infected treatment-experienced patients: systematic review and meta-analysis. *HIV Clin Trials*. 2017;18(1):17–27.
38. Mills A, Arribas JR, Andrade-Villanueva J, et al. Switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide in antiretroviral regimens for virologically suppressed adults with HIV-1 infection: a randomised, active-controlled, multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):43–52.
39. Arribas JR, Thompson M, Sax PE, et al. Brief report: randomized, double-blind comparison of tenofovir alafenamide (TAF) vs tenofovir disoproxil fumarate (TDF), each coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine (E/C/F) for initial HIV-1 treatment: week 144 results. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017; 75(2):211–8.
40. Wang H, Lu X, Yang X, Xu N. The efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral regimens for HIV-1 therapy: Meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(41):e5146.
41. Badiou S, De Boever CM, Terrier N, Baillat V, Cristol JP, Reynes J. Is tenofovir involved in hypophosphatemia and decrease of tubular phosphate reabsorption in HIV-positive adults? *J Infect*. 2006;52(5): 335–8.
42. Day SL, Leake Date HA, Bannister A, Hankins M, Fisher M. Serum hypophosphatemia in tenofovir disoproxil fumarate recipients is multifactorial in origin, questioning the utility of its monitoring in clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38(3):301–4.
43. Mateo L, Holgado S, Mariñoso ML, et al. Hypophosphatemic osteomalacia induced by tenofovir in HIV-infected patients. *Clin Rheumatol*. 2016;35(5):1271–9.

July 7, 2019

Re: **BONE INVOLVEMENT IN HIV-INFECTED, ANTIRETROVIRAL TREATMENT–NAÏVE MEN WHO HAVE SEX WITH MEN**

Dear Editor:

Enclosed for your consideration for publication in PLOS ONE. I am the corresponding author and I attest that this work is not under active consideration for publication, has not been accepted for publication, nor has it been published, in full or in part. All the authors —, Patricia Atencio, Francisco M. Conesa-Buendía, Ramón Pérez-Tanoira, Laura Prieto-Pérez, Beatriz Álvarez, Rosa Arboiro, Manuel Díaz-Curiel, Manuel L. Fernández-Guerrero, Gabriel Herrero-Beaumont, Aránzazu Mediero, Miguel Górgolas and myself — have participated in the conception, design, analysis and interpretation, the drafting and approval of the final version, and may assume public responsibility for the content of the paper.

We believe this paper will be of interest to readers of PLOS ONE because it provides information about low bone mineral density as a non–AIDS-related event in young HIV-infected men who have not received previous antiretroviral treatment. This issue has been previously addressed in elderly people who lives with HIV (Compston J. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014) (Battalora L. *Antivir Ther.* 2016) (Bonjoch A. *AIDS* 2010) (Kooij KW. *J Infect Dis.* 2015), but there are hardly any studies which has evaluated this condition in newly infected young people before starting HAART (Grijzen ML, *AIDS.* 2010).

This is a research article, and there are no prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript.

Please address all correspondence about the manuscript or proofs to me at:

Cabello A., Ph.D., M.D.
Division of Infectious Diseases
Fundación Jiménez Díaz University Hospital
Madrid 28040, Spain
Phone: +34 915504800; E-mail: acabello@fjd.es

Thank you for your consideration of this manuscript.

Best regards,

Alfonso Cabello

Bone involvement in HIV-infected, antiretroviral-treatment-naïve men who have sex with men

Patricia Atencio^{1†}, Alfonso Cabello^{1†*}, Francisco M. Conesa-Buendía², Ramón Pérez-Tanoira¹, Laura Prieto-Pérez¹, Beatriz Álvarez¹, Rosa Arboiro³, Manuel Díaz-Curiel³, Manuel L. Fernández-Guerrero¹, Gabriel Herrero-Beaumont^{2,4}, Aránzazu Mediero² and Miguel Górgolas¹.

¹Division of Infectious Diseases. Fundación Jiménez Díaz University Hospital. Autónoma University of Madrid (UAM). Madrid, Spain.

²Bone and Joint Research Unit, IIS-Fundación Jiménez Díaz. Autónoma University of Madrid. Madrid, Spain.

³Metabolic Bone Diseases, Internal Medicine Department. Fundación Jiménez Díaz University Hospital. Autónoma University of Madrid, Spain

⁴Rheumatology Department. Fundación Jiménez Díaz University Hospital. Autónoma University of Madrid, Spain.

*Corresponding author

E-mail: acabello@fjd.es

[†]These authors contributed equally to this work.

33 Abstract

34 Low bone mineral density has been described as a non–AIDS-related event in HIV-
35 patients but it is poorly studied in young HIV-infected men who have received no previous
36 ART. A cross-sectional study of HIV-infected MSM under the age of 50 years who had
37 received no previous ART was carried out in a tertiary teaching hospital between January
38 1, 2014 and September 30, 2017.

39 A total of 233 patients were included. All of them were men who has sex with men with a
40 mean age of 34.7 years (\pm 6.6; IQR: 30–40), 68% were Caucasian and 29.3% Latin
41 American. At the time of diagnosis, 91% of patients had stage-A and the median CD4+ T-
42 cell count was 481 cells/ μ L (IQR, 320–659). Ten percent had a count below 200 CD4
43 cells/ μ L, and 40% had a CD4/CD8 cell-count ratio below 0.4. The median time elapsed
44 between HIV diagnosis and DXA scan was 3.3 months. Regarding lifestyle patterns and
45 risk factors, 14.1% presented underweight, 36.1% engaged in no regular exercise, 51.9%
46 had previous exposure to tobacco and 35.3% reported drug use. Abnormally low levels of
47 vitamin D were seen in 87.6% of the men studied. Overall, 64% presented bone
48 involvement, 53% with osteopenia, and 11% with osteoporosis. BMD osteoporosis
49 measurements were associated with altered 25(OH)D levels, and greater bone
50 involvement was observed among Latin American patients (75% vs. 52%, $P=0.03$). No
51 other significant differences in risk factors were observed. In the metabolism substudy
52 ($n=133$) a significant increase ($P=0.016$) in CTX levels we observed among patients with
53 osteoporosis.

54 We find high prevalence of bone involvement among HIV-infected MSM before initiation of
55 ART. Further studies are necessary to evaluate if BMD assessment should be
56 recommended in young HIV-infected patients.

57

58 Introduction

59 Owing to the improvements ushered in by highly active antiretroviral therapy
60 (HAART), nowadays people living with HIV (PLWHIV) develop few AIDS events.¹ In recent
61 years, however, there has been a steady rise in so-called non-AIDS-related events, such
62 as cardiovascular events, non-AIDS-defining tumors, as well as bone involvement and
63 abnormally low bone mineral density (BMD).²

64 Bone involvement, defined as the presence of osteopenia or osteoporosis on a dual
65 energy x-ray absorptiometry (DXA) scan, has been the subject of numerous studies, most
66 of which have focused on bone toxicity associated with antiretroviral therapy (ART). A
67 number of clinical trials have described reduced BMD during the first or second year of
68 ART, independently of the type of therapy^{3,4}; in particular, tenofovir disoproxil fumarate
69 (TDF) and protease inhibitors (PIs) have been associated with higher rates of medium-
70 and long-term bone toxicity.⁴ As a result, the primary international practice guidelines
71 recommend performing a DXA scan in HIV-infected individuals over the age of 50 years.^{1,5}

72 The factors that contribute to bone involvement are widely known and include age,
73 vitamin D deficiency, tobacco and alcohol consumption, and a sedentary lifestyle, among
74 others^{6,7}, indeed. Many PLWHIV also present these risk factors.^{3,6} In addition, individuals
75 with HIV infection exhibit a marked proinflammatory state even after beginning ART, a
76 treatment that leads to a further reduction in BMD. It is therefore to be expected that young
77 HIV-infected persons will have lower bone mass than similar populations without the
78 disease, even prior to initiation of ART.

79 The aim of this study is to assess bone involvement and risk factors that may
80 contribute to the onset of osteopenia or osteoporosis among HIV-infected men under 50
81 years of age who have sex with men (MSM) and who have received no previous ART.

82

83

84 **Material and Methods**

85 A cross-sectional study of HIV-infected MSM under the age of 50 years who had
86 received no previous ART was carried out in a tertiary teaching hospital in central Madrid,
87 Spain.

88

89 **Subjects and study design; Inclusion criteria and ethical concerns**

90 Adult MSM under the age of 50 years with a recent diagnosis of HIV infection were
91 included in this study between January 1, 2014 and September 30, 2017. All subjects
92 underwent a baseline DXA scan performed either before beginning ART or a maximum of
93 2 weeks after this treatment had begun. Further, all patients who began treatment
94 between May 1 and September 30, 2017 were invited to participate in a substudy on bone
95 metabolism; individuals who agreed to take part were tested to measure parameters
96 related to bone and mineral metabolism before beginning HAART. The study was
97 approved by the hospital ethics committee.

98

99 **Measurements and reference values**

100 We gathered such epidemiologic data as age, race, and country of origin. Lifestyle-
101 related aspects used as study variables included alcohol, tobacco, and drug consumption,
102 physical activity, and approximate calcium intake. Additionally, anthropometric data were
103 collected for all patients studied. Blood samples were analyzed for values related to
104 calcium-phosphate metabolism (i.e., calcium, phosphorus, 25-hydroxyvitamin D
105 (25[OH]D), parathyroid hormone levels, thyroid hormones, kidney function); and
106 immunologic and virologic parameters (i.e., CD4+, CD8+, and HIV-1 viral load). DXA
107 scans of the lumbar spine and femoral neck were performed before the start of ART.
108 When assessing patients for the presence of osteopenia (op) and osteoporosis (OP), we
109 used the definitions published in the World Health Organization (WHO) guidelines. Other

110 parameters related to bone metabolism used in this study included osteocalcin, adenosine
111 deaminase (ADA), carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX-1), and N-terminal
112 propeptide of procollagen type 1 (P1NP).

113

114 Underweight was defined as a body mass index (BMI) of $<20 \text{ kg/m}^2$. Parameters
115 considered to be within the normal range were those that met the criteria appearing in
116 international guidelines. The values related to bone and mineral metabolism used were the
117 following: 25(OH)D ($>30 \text{ ng/ml}$), ADA (0–15 U/L), CTX (0.064–0.548 ng/ml), P1NP (10.4–
118 62 ng/ml), osteocalcin (14–46 ng/ml), and parathormone (10–70 pg/ml). Patients were
119 classified as smokers if they were current or past tobacco users; as consumers of alcohol
120 if their total intake was over 330 g/day; and drug users (cocaine, mephedrone,
121 amphetamines, ketamine, GHB) if any of these drugs were taken at least once weekly. For
122 the purposes of this study, sufficient physical exercise was a minimum of 120 minutes per
123 week. Three servings of calcium-rich foods (e.g., milk, cheese, other dairy products) daily
124 was considered an appropriate intake. We also recorded corticosteroid administration (at
125 least 5 mg/day over 10 days or more) over the previous 3-year period.

126

127 **Statistical Analysis**

128 Qualitative variables were expressed in terms of frequency and percentages. Based
129 on the results of the Kolmogorov-Smirnov test for normality, quantitative variables were
130 measured as either mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR).
131 Qualitative variables were analyzed using the Chi-squared test or Fisher's exact test.
132 Quantitative variables were compared using Student's t test. Statistical significance was
133 set at P values <0.05 for all measurements. The Stata 14 package was used for statistical
134 analyses.

135

136

137 **Results**

138 A total of 233 patients were included, all of whom were men. The main patient
 139 characteristics appear in Table 1. The mean age of the patients was 34.7 years (\pm 6.6;
 140 IQR: 30–40), 68% of whom were Caucasian (87.7% Spanish), and 29.3% were of Latin
 141 American descent. All patients had been infected with the HIV virus through sexual
 142 intercourse (MSM). At the time of diagnosis, 91% of patients had stage-A disease
 143 according to the classic CDC classification system, and the median CD4+ T-cell count was
 144 481 cells/ μ L (IQR, 320–659). Ten percent of these stage-A patients had a count below 200
 145 CD4 cells/ μ L, and 40% had a CD4/CD8 cell-count ratio below 0.4. The median time
 146 elapsed between diagnosis and DXA scan was 3.3 months.

147

148 **Table 1. Main characteristics of patients.**

149

Baseline Characteristics	N = 233 patients	
Sex	Male (100%)	
Route of transmission	MSM (100%)	
Age (mean)	34 (IQR, 30–40)	
Race	Caucasian (68%)	Spanish (87.7%)
	Latin American (29.3%)	
Stage	A (91%) B (6%) C (3%)	
CD4 (median)	481cel/ μ L (IQR, 330–653)	
CD4 < 200 cel/ μ L	10%	
CD4 / CD8 < 0.4	41%	
Coinfection (HCV antibody/ HVB antigen)	2%	
Time between HIV diagnosis and DEX scan (median)	3.3 months	

150

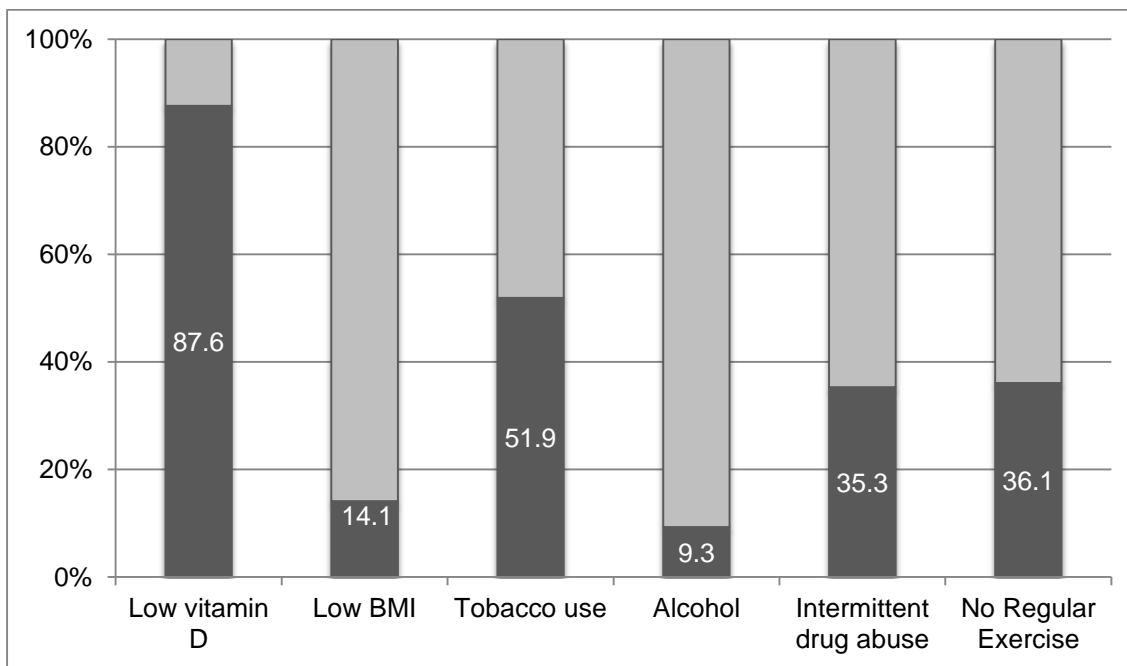
151

152 Regarding lifestyle patterns and risk factors associated with lower BMD (Fig 1),
153 14.1% presented underweight, 36.1% engaged in no regular exercise, 51.9% had previous
154 exposure to tobacco, 35.3% reported drug use, and 9.3% drank alcohol habitually.
155 Abnormally low levels of vitamin D were seen in 87.6% of the men studied.

156

157 **Figure 1. Possible associated risk factors (all patients).**

158

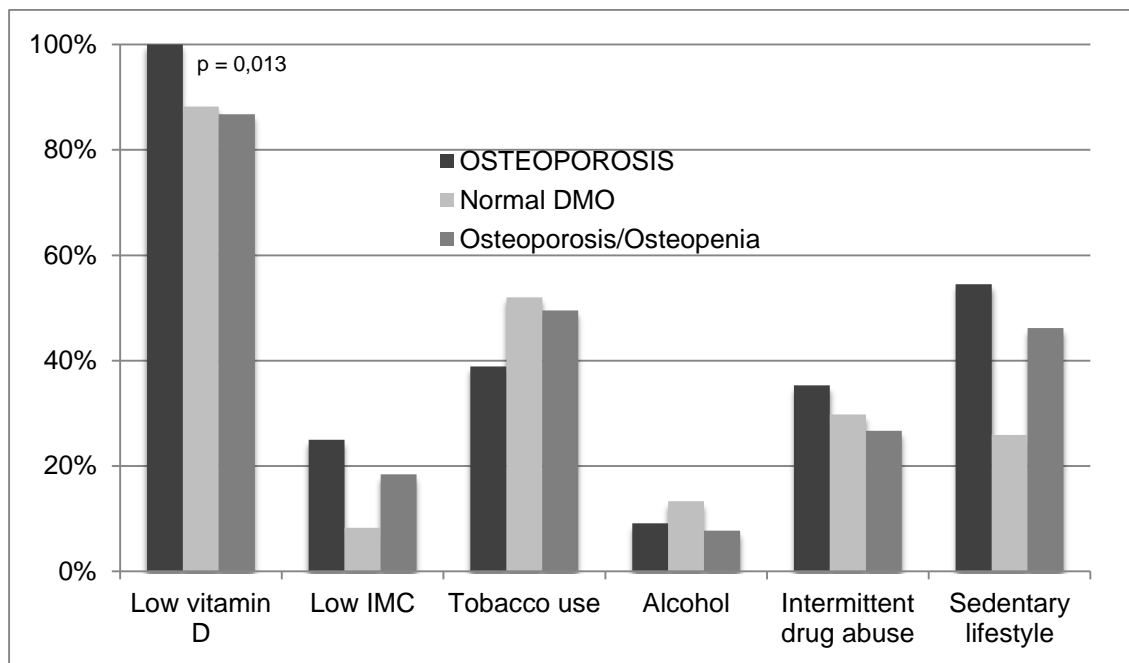


159
160

161 Overall, 64% presented bone involvement, 53% with osteopenia, and 11% with
162 osteoporosis. Osteoporosis of the lumbar spine was detected in 11% of patients (48% of
163 these presenting osteopenia), while only 1% of patients were found to have osteoporosis
164 of the femoral neck (44% osteopenia). Regarding the value of the Z score, 24% of the
165 patients had a bone density lower than that expected for their age (Z-score < -2). BMD
166 measurements indicating presence of osteoporosis were associated with altered 25(OH)D
167 levels when compared to patients with a normal DXA scan. Within the different subgroups
168 studied (osteoporosis vs. no osteoporosis, bone involvement vs. normal BMD
169 measurements), no significant differences were observed for the other risk factors studied
170 or for patient age or lifestyle factors. Greater bone involvement was observed among Latin

171 American patients (75% vs. 52%, $P=0.03$), though no significant association was found for
172 other factors (Fig 2).

173 **Figure 2. Values of risk factors in patients with osteoporosis (OP), normal findings**
174 **and any osteopenia or osteoporosis in the DXA scan.**
175



176
177

178 The metabolism substudy ($n=133$) analyzed parameters related to bone metabolism. We
179 observed a statistically significant increase ($P=0.016$) in CTX levels among patients with
180 osteoporosis compared to those who had a normal DXA scan (Fig 3) (Table 2). There was
181 a higher percentage of altered CTX and P1NP values among osteoporotic patients than
182 patients with a normal DXA scan; among these, a higher prevalence of low osteocalcin
183 levels was seen relative to patients with osteoporosis (Fig 4 A–C).

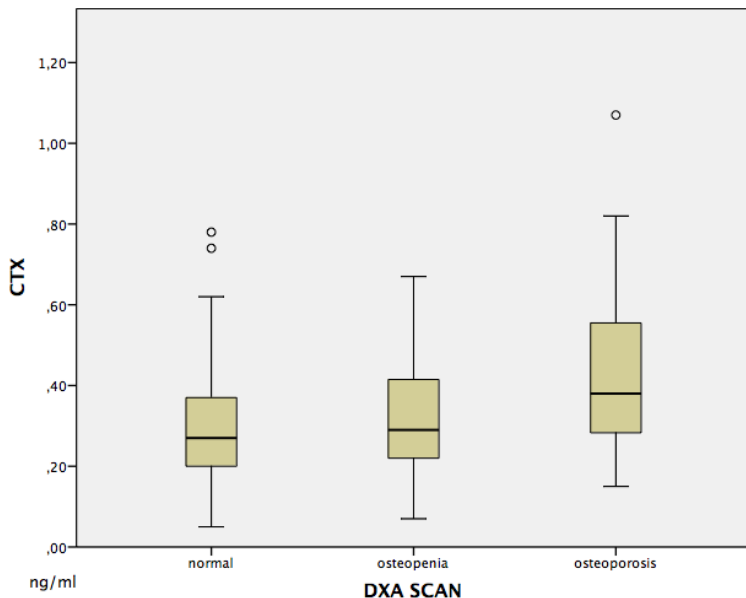
184
185
186
187
188
189
190
191

192

193

194 **Figure 3: Collagen carboxyterminal telopeptide (CTX) levels were higher in patients**
195 **with osteoporosis compared to those who presented a normal value on DXA scan.**

196



197

198

199

200 **Table 2. Differences in altered bone metabolism markers based on the finding of**
201 **DXA scans.**

202

	Osteoporosis vs Osteopenia			Osteoporosis vs Normal		
	Osteoporosis	Normal DXA	<i>P</i> value	Osteoporosis/ Osteopenia	Normal DXA	<i>P</i> value
25 OH Vit	20.35 ± 8.49	20.65 ± 7.33	<i>p</i> = 0.898	20.47 ± 7.45	20.65 ± 7.33	<i>P</i> = 0.907
Calcium	9.49 ± 0.45	9.50 ± 0.42	<i>P</i> = 0.903	9.35 ± 0.46	9.50 ± 0.42	<i>P</i> = 0.104
PTH	35.69 ± 18.47	39.57 ± 13.82	<i>P</i> = 0.489	38.43 ± 18.56	39.57 ± 13.82	<i>P</i> = 0.790
CTX	0.46 ± 0.26	0.31 ± 0.16	<i>P</i> = 0.016	0.36 ± 0.19	0.31 ± 0.16	<i>P</i> = 0.252
P1NP	50.34 ± 19.48	43.51 ± 17.06	<i>P</i> = 0.203	45.43 ± 16.09	43.51 ± 17.06	<i>P</i> = 0.564
ADA	15.31 ± 5.46	18.03 ± 9.34	<i>P</i> = 0.293	16.26 ± 6.69	18.03 ± 9.34	<i>P</i> = 0.254
OC	20.12 ± 6.89	16.94 ± 7.18	<i>P</i> = 0.141	17.41 ± 6.29	16.94 ± 7.18	<i>P</i> = 0.718
TRAP	3.19 ± 1.07	3.07 ± 0.82	<i>P</i> = 0.676	3.23 ± 1.27	3.07 ± 0.82	<i>P</i> = 0.475
CD4 naïve	465.67 ± 228.22	464.23 ± 219.04	<i>P</i> = 0.983	528.56 ± 265.55	464.23 ± 219.04	<i>P</i> = 0.188
CD4/CD8	0.55 ± 0.29	0.46 ± 0.27	<i>P</i> = 0.274	0.55 ± 0.28	0.46 ± 0.27	<i>P</i> = 0.090

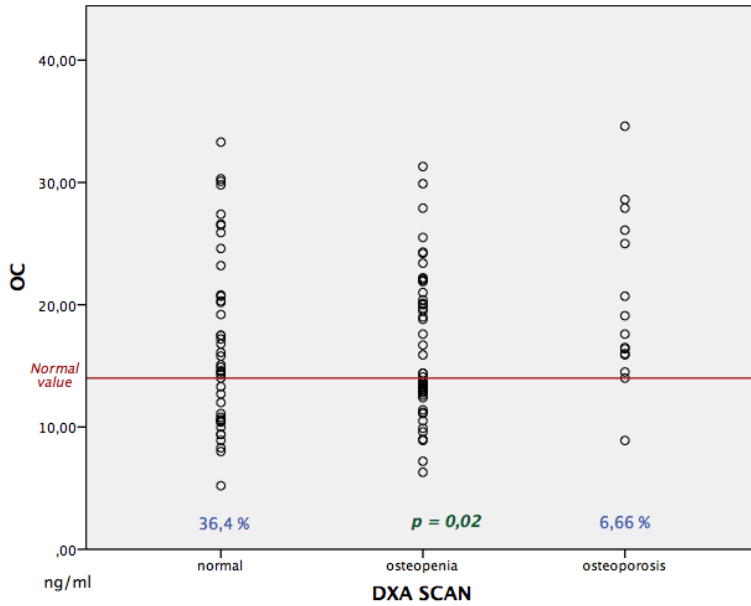
203

204

205

206 **Figure 4A. Osteocalcin (OC) levels were higher in patients with osteoporosis**
207 **compared to those without osteoporosis on DXA scan.**

208

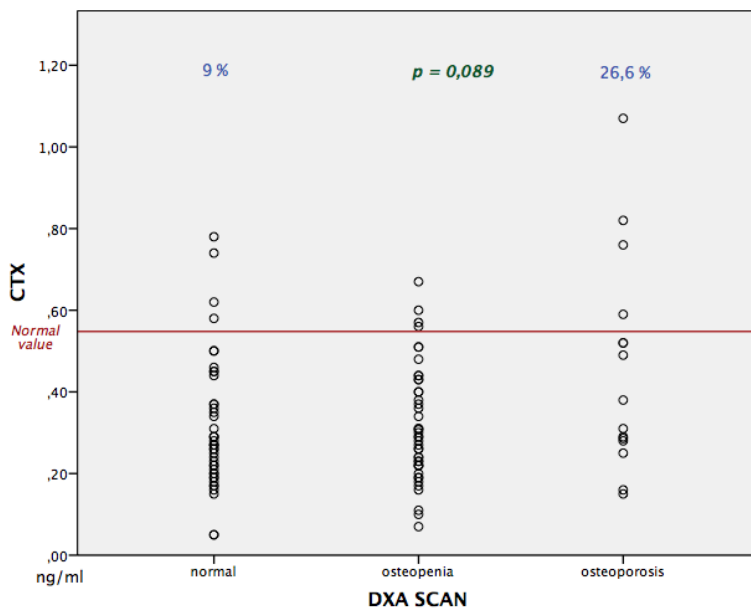


209

210

211 **Figure 4B. Carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX-1) levels were higher in**
212 **patients with osteoporosis compared to those without osteoporosis on DXA scan.**

213



214

215

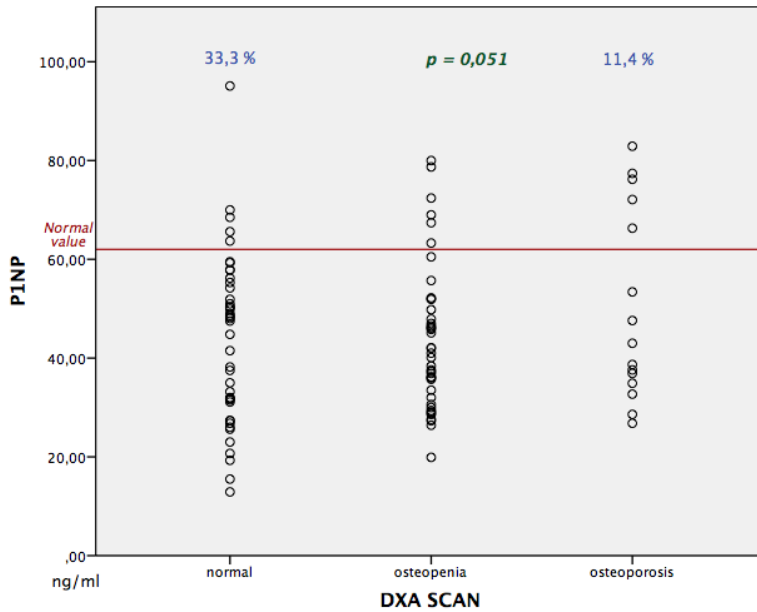
216

217

218

219
220
221
222
223

Figure 4C. N-terminal propeptide of procollagen type 1 (P1NP) levels were higher in patients with osteoporosis compared to those without osteoporosis on DXA scan.



224
225
226

227 Discussion

228 Our results reveal a high prevalence of bone involvement among HIV-infected MSM
229 before initiation of ART, with 11% of these patients presenting BMD values indicative of
230 osteoporosis (T-score < -2.5) and 24% of the patients with a bone density lower than that
231 expected for their age (Z-score < -2). Currently, the primary guidelines and international
232 consensus statements recommend that patients who are infected with the HIV virus
233 undergo bone testing if they are over the age of 50 years^{5,8,9} or have a history of
234 pathologic fractures. These publications further advise clinicians to avoid ART regimens
235 that pose a risk of bone toxicity, such as tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and protease
236 inhibitors (PI), if the patient has existing bone involvement or frailty and fragility
237 fracture.^{1,5,10,11} Our findings suggest that this recommendation may be revised, as over
238 50% of the study population, which consisted of MSM under age 50, had low BMD levels

239 for their age, and 11% of these patients presented osteoporosis. As there is still no
240 curative treatment for HIV infection, it is foreseeable that these patients will continue
241 requiring ART for years to come, thus putting them at an increased risk of loss of bone
242 mass.

243 It is highly likely that the lifestyle of the study population, and not their HIV-infected status,
244 is the primary factor behind such high rates of osteopenia and/or osteoporosis. Previous
245 studies have described various factors that may contribute to a decrease in BMD and an
246 increased risk of fracture among patients infected with HIV. These include low BMI,
247 alcohol and tobacco consumption, prolonged use of corticosteroids, low vitamin D levels,
248 growth hormone deficiency, hypogonadism, and inflammatory processes, among others.
249 Nearly all these conditions have been found to be more prevalent among subjects with
250 chronic HIV infection over many years who have undergone years of previous
251 treatment.^{10,12-14} Ours is the first study to analyze this aspect in patients recently
252 diagnosed with HIV infection but who have yet to begin ART.

253 A number of factors associated with HIV infection, such as kidney disease, liver disease,
254 or diabetes, can contribute to a loss of bone mass over the years, thereby placing the
255 patient at a greater risk of fracture. Indeed, patients with no other known comorbidities
256 may be prone to a loss of bone mass due to the effects of the proinflammatory state
257 caused by the infection.^{6,15,16} Whichever the therapy administered, initiation of ART has
258 been shown to have a negative initial impact on BMD, and this deleterious effect is more
259 intense and long-lasting when the treatment involves TDF or PI.^{3,17} In 2012, Hansen et al.
260 described a higher risk of fracture among patients with HIV infection when compared to a
261 healthy control group. In the study, risk of low-energy fracture was associated with
262 exposure to HAART, the presence of comorbidities, and tobacco consumption.¹⁸
263 Consequently, several factors may have a negative impact on future bone metabolism in a
264 young patient recently diagnosed with HIV infection, and thus preventive measures could

265 be more effective if their baseline characteristics are known and their degree of bone
266 mineralization has been studied.

267 Special attention should be given to vitamin D status and its impact on bone metabolism in
268 these patients. In recent years, a number of studies have suggested that patients living
269 with HIV infection have a high prevalence of vitamin D deficit independently of their
270 geographic origin (i.e., Europe, Australia, or the Americas, among other regions).¹⁹⁻²¹ In
271 addition to its deleterious impact on patients with HIV infection, vitamin D deficiency is a
272 well-established risk factor for bone disease within the general population.²² Indeed, recent
273 publications suggest that the functions of vitamin D go beyond the skeleton, and that
274 vitamin D may play a role in regulating cardiovascular and immunologic parameters.²³⁻²⁵
275 Though some studies have described a protective role played by vitamin D in which this
276 vitamin prevents loss of bone mass,²⁶ much remains unknown as to the degree to which
277 vitamin D deficiency contributes to this loss and to an increase in risk of fracture among
278 HIV-infected patients. Recent findings associate this deficiency with fractures of the
279 vertebra in these patients, thus lending further credibility to the notion that appropriate
280 vitamin D levels can play a role in preserving the health of these subjects and also
281 suggesting that levels of vitamin D should be included in the screening of bone fragility in
282 this population.²⁷

283 The results of our substudy on bone parameters show how certain patients with
284 osteoporosis differ from patients with a normal DXA scan in terms of markers of bone
285 turnover, both those of bone formation (osteocalcin and P1NP) and resorption (CTX).
286 However, these differences were slight or altogether absent in most cases, as occurred
287 when HIV-negative patients with evidence of bone alterations on DXA scan were
288 compared to patients with no such findings.²⁸ This may be reflective of the fact that
289 conventional densitometric methods are not the optimal means of measuring bone
290 involvement. Despite the limits of these measures, some of the differences observed

291 between patients with osteoporosis and those with a normal DXA scan point to avenues
292 for potential future investigations to shed further light on these aspects and continue the
293 search for parameters that may be used to predict bone involvement in these patients.

294

295 This research has certain limitations. First, the fact that this is a single-center study may
296 have influenced the interpretation of some of our results, as a similar study performed in
297 another geographic location may find an increase or a decrease in the same parameters
298 observed, mostly due differences in climate and lifestyle in the different locales. Spain has
299 a comparatively high number of hours of sunlight, and with the exception of children,
300 citizens are not recommended to supplement their intake with foods with a high vitamin-D
301 content; nonetheless, lifestyle factors, primarily in large cities, can lead to low exposure to
302 sunlight in the fall and winter months. A second limitation concerns the lack of a study
303 group consisting of individuals not infected with the HIV virus; nonetheless, our results can
304 be contrasted with well-established findings from studies conducted in the general
305 population. Though our cohort consists of individuals who have lived with HIV infection for
306 a short time, certain bias may have been introduced in this regard, as some of the patients
307 studied had no previous tests with a negative result, thus making exact data on cumulative
308 time of infection unavailable. However, the fact that over 90% of patients had stage-A
309 disease indicates an appropriate degree of homogeneity. Third, the sample size of the
310 metabolism substudy may limit the ability to detect differences, although the findings of this
311 substudy suggest certain findings that merit further study with larger populations.

312 The most significant limitation of our research stems from the lack of a validated means of
313 screening for bone involvement in patients with HIV infection. Indeed, neither the Fracture
314 Risk Assessment Tool (FRAX) nor densitometric methods have been validated in young
315 people or in the population of individuals living with HIV infection.^{1,8,29,30} The inclusion of
316 densitometry as part of the baseline assessment of patients infected with the HIV virus

317 would not be used to diagnose any particular disease, though it would lead clinicians to
318 stress lifestyle habits that promote the health of the patient's bone mass and avoid
319 prescribing antiretroviral or other drugs that lead to a loss of bone mass. Similarly, a
320 diagnosis of osteoporosis at an early age would impact the follow-up approach given to
321 certain patients. As stated above, an increased risk of bone fracture has been found
322 among patients with HIV infection when compared to HIV-negative individuals; however,
323 these studies have not found a correlation between abnormal DXA measurements and
324 subsequent fracture.³⁰ As a result, we argue that the most appropriate strategy when
325 treating young patients with moderate or severe bone involvement evidenced on DXA
326 scan should be in accordance with the general recommendations of scientific societies,
327 that is, a conservative approach that avoids targeted therapies such as biphosphonate at
328 early ages, due to the possible side effects of this therapy; rather, treatment should seek
329 to control risk factors from early on.

330

331 Despite the limitations discussed above, we believe that the large number of
332 patients included in this study lends validity to its findings and makes the case for baseline
333 examinations of bone density to improve the clinical management of MSM living with HIV
334 infection.

335

336 **Acknowledgments**

337 We would like to acknowledge Oliver Saw for his collaboration in the translation of the
338 manuscript, and Ignacio Mahillo for his collaboration in the statistical analysis.

339

340

341 **Funding**

342 This work has not received funding. It has received no specific grant from any funding
343 agency in the public, commercial or not-for-profit sectors. The author(s) received no
344 specific funding for this work.

345

346

347 **Conflict Of Interests**

348 AC has received honoraria and speakers' fees from Gilead Sciences, MSD and ViiV. MG
349 has received speakers' fees from ViiV. All the authors have declared that no competing
350 interests exist.

351

352

353 **Authors' Contributions**

354 PA, AC, and MG conceived the study, participated in its design, data analysis and drafted
355 the manuscript. PA, AC, FMCB and RPT have participated in data collection, design and
356 drafted the manuscript. LPP, BA, RA, MDC, MLFG, GHB and AM have participated in its
357 design and drafted the manuscript. All the authors contributed to the final version of the
358 manuscript.

359

360

361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411

References

1. Negredo E, Domingo P, Gutierrez F, et al. Executive summary of the consensus document on osteoporosis in HIV-infected individuals. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;may 31. Available at: <http://www.gesida-seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/gesidadcyrc2013-Documentoconsenso-asistenciaVIHMujeres.pdf>.
2. Althoff KN, McGinnis KA, Wyatt CM, et al. Comparison of Risk and Age at Diagnosis of Myocardial Infarction, End-Stage Renal Disease, and Non-AIDS-Defining Cancer in HIV-Infected Versus Uninfected Adults. *Clin Infect Dis*. 2014;60(4):627-638.
3. Tinago W, Cotter AG, Sabin CA, et al. Predictors of longitudinal change in bone mineral density in a cohort of HIV-positive and negative patients. *Aids*. 2017;31(5):643-652.
4. Moran C, Weitzmann M, Ofotokun I. Bone Loss in HIV Infection. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2017;9(1):52-67.
5. European AIDS Clinical Society. EACS Guidelines 2018. 2018;44(October):7032.
6. Compston J. Osteoporosis and fracture risk associated with HIV infection and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2014;43(3):769-780.
7. Dong H V., Cortés YI, Shiau S, Yin MT. Osteoporosis and fractures in HIV/hepatitis C virus coinfection: A systematic review and meta-analysis. *Aids*. 2014;28(14):2119-2131.
8. Lozano F, Buzón M, Curran A, et al. Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Documento consenso de GeSIDA sobre control y monitorización de la infección por el VIH (Actualización abril 2018). 2018.
9. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Department of Health and Human Services. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV Developed by the DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults. Available at: <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf>.
10. Brown TT, Hoy J, Borderi M, et al. Recommendations for Evaluation and Management of Bone Disease in HIV. *Clin Infect Dis*. 2015;60(8):1242-1251.
11. Mills A, Arribas JR, Andrade-Villanueva J, et al. Switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide in antiretroviral regimens for virologically suppressed adults with HIV-1 infection: a randomised, active-controlled, multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):43-52.
12. Battalora L, Buchacz K, Armon C, et al. Low bone mineral density and risk of incident fracture in HIV-infected adults. *Antivir Ther*. 2016;21(1):45-54.
13. Bonjoch A, Figueras M, Estany C, et al. High prevalence of and progression to low bone mineral density in HIV-infected patients: a longitudinal cohort study. *AIDS*.

- 412 2010;24(18):2827-33.
413
- 414 14. Bedimo R, Cutrell J, Zhang S, et al. Mechanisms of bone disease in HIV and
415 hepatitis C virus: Impact of bone turnover, tenofovir exposure, sex steroids and
416 severity of liver disease. *Aids*. 2016;30(4):601-608.
417
- 418 15. Grijzen ML, Vrouenraets SME, Steingrover R, et al. High prevalence of reduced
419 bone mineral density in primary HIV-1-infected men. *AIDS*. 2010;24(14):2233-8.
420
- 421 16. Kooij KW, Wit FWNM, Bisschop PH, et al. Low bone mineral density in patients with
422 well-suppressed HIV infection: Association with body weight, smoking, and prior
423 advanced HIV disease. *J Infect Dis*. 2015;211(4):539-548.
424
- 425 17. Gutiérrez F, Masiá M. The Role of HIV and Antiretroviral Therapy in Bone Disease.
426 *AIDS Rev*. 2011;13:109-118.
427
- 428 18. Hansen A-BE, Gerstoft J, Kronborg G, et al. Incidence of low and high-energy
429 fractures in persons with and without HIV infection: a Danish population- based
430 cohort study. *Aids*. 2012;26(3):285-293.
431
- 432 19. Klassen KM, Fairley CK, Kimlin MG, Hocking J, Kelsall L, Ebeling PR. Vitamin D
433 deficiency is common in HIV-infected southern Australian adults. *Antivir Ther*.
434 2016;21(2):117-125.
435
- 436 20. Jao J, Freimanis L, Mussi-Pinhata MM, et al. Low Vitamin D status among pregnant
437 Latin American and Caribbean women with HIV Infection. *Int J Gynecol Obstet*.
438 2015;130(1):54-58.
439
- 440 21. Cervero M, Agud J, García-Lacalle C, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and
441 its related risk factor in a Spanish cohort of adult HIV-infected patients: Effects of
442 antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28:963-971.
443
- 444 22. Parfitt A. Dietary risk factors for age-related bone loss and fractures. *Lancet*.
445 1983;2:1181-1185.
446
- 447 23. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Gangemi S, Iaria C, Cascio A. Vitamin D deficiency
448 in HIV infection: Not only a bone disorder. *Biomed Res Int*. 2015;2015
449
- 450 24. Trochoutsou A, Kloukina V, Samitas K, Xanthou G. Vitamin-D in the Immune
451 System: Genomic and Non-Genomic Actions. *Rev Med Chem*. 2015;15:953-963.
452
- 453 25. Mocanu V, Oboroceanu T, Zugun-Eloae F. Current status in vitamin D and
454 regulatory T cells—Immunological implications. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*.
455 2013;117:965-973.
456
- 457 26. Overton E, Chan E, Brown T, et al. High-Dose Vitamin D and Calcium Attenuates
458 Bone Loss with Antiretroviral Therapy Initiation. *Ann Intern Med*. 2015;162(12):815-
459 824.
460
- 461 27. Atteritano M, Mirarchi L, Venanzi-Rullo E, et al. Vitamin D Status and the
462 Relationship with Bone Fragility Fractures in HIV-Infected Patients: A Case Control
463 Study. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):119.

- 464
465 28. Biver E, Calmy A, Delhumeau C, Durosier C, Zawadynski S, Rizzoli R.
466 Microstructural alterations of trabecular and cortical bone in long-term HIV-infected
467 elderly men on successful antiretroviral therapy. *Aids*. 2014;28(16):2417-2427.
468
- 469 29. Mascolini M. Modified FRAX tool underestimates fracture rates in older men with
470 HIV. In: *CROI Conference , Seattle, Washington*.
471
- 472 30. Yin MT, Shiao S, Rimland D, et al. Fracture prediction with modified-FRAX in older
473 HIV-infected and uninfected men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72(5):513-
474 520.
475
476

Figure 1. Possible associated risk factors (all patients).

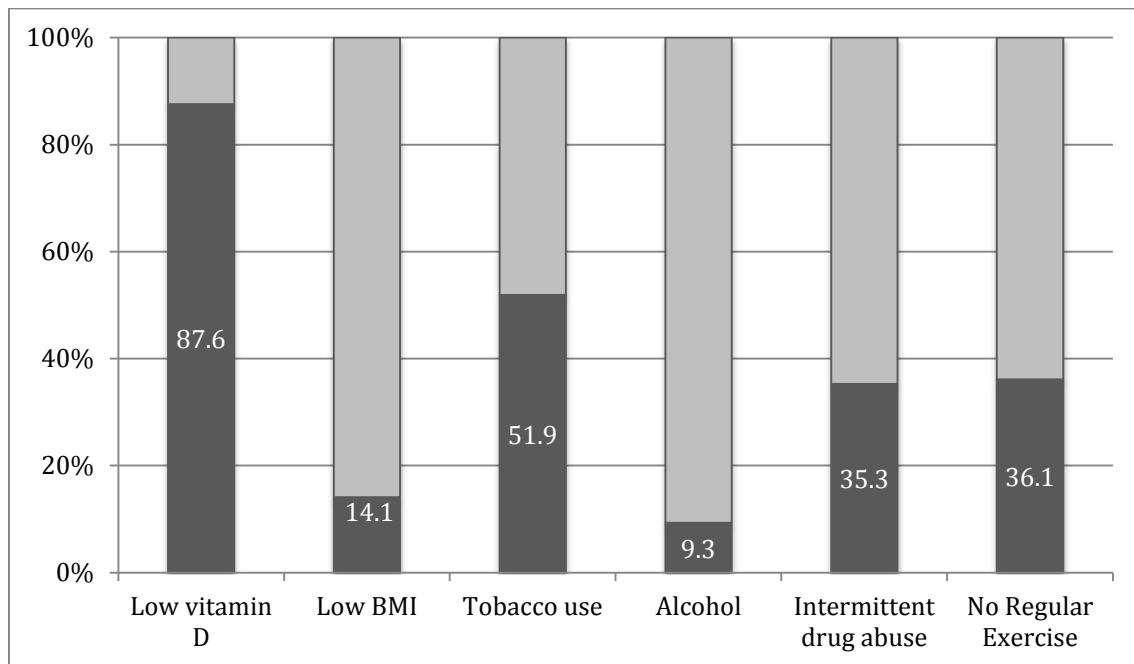


Figure 2. Values of risk factors in patients with osteoporosis (OP), normal findings and any osteopenia or osteoporosis in the DXA scan.

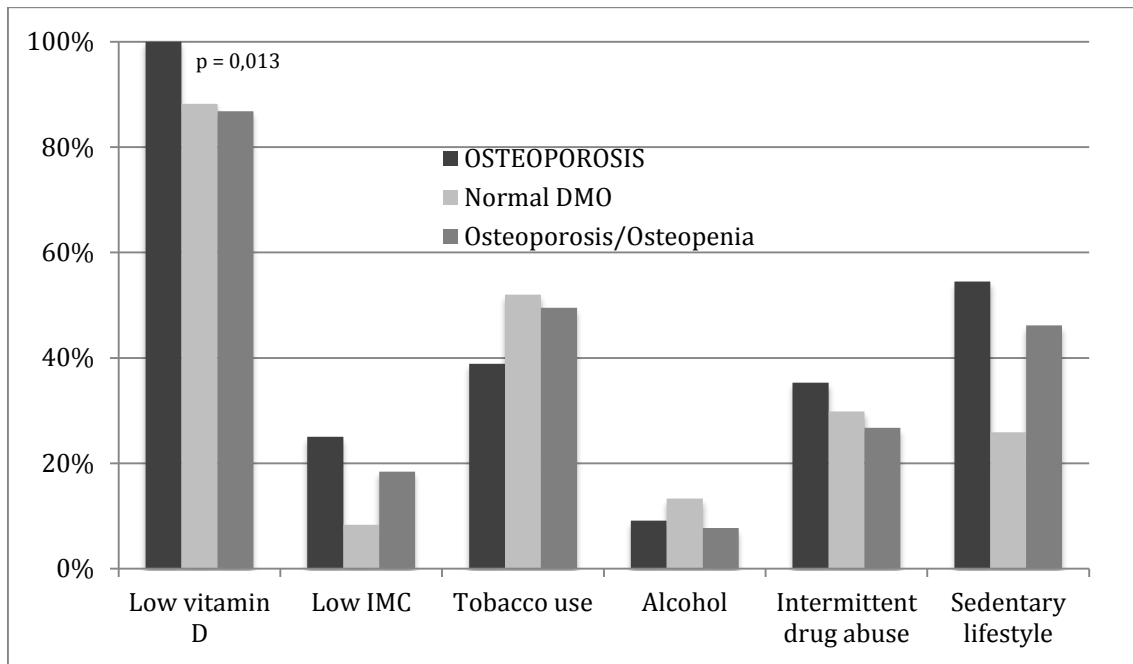


Figure 3: Collagen carboxyterminal telopeptide (CTX) levels were higher in patients with osteoporosis compared to those who presented a normal value on DXA scan.

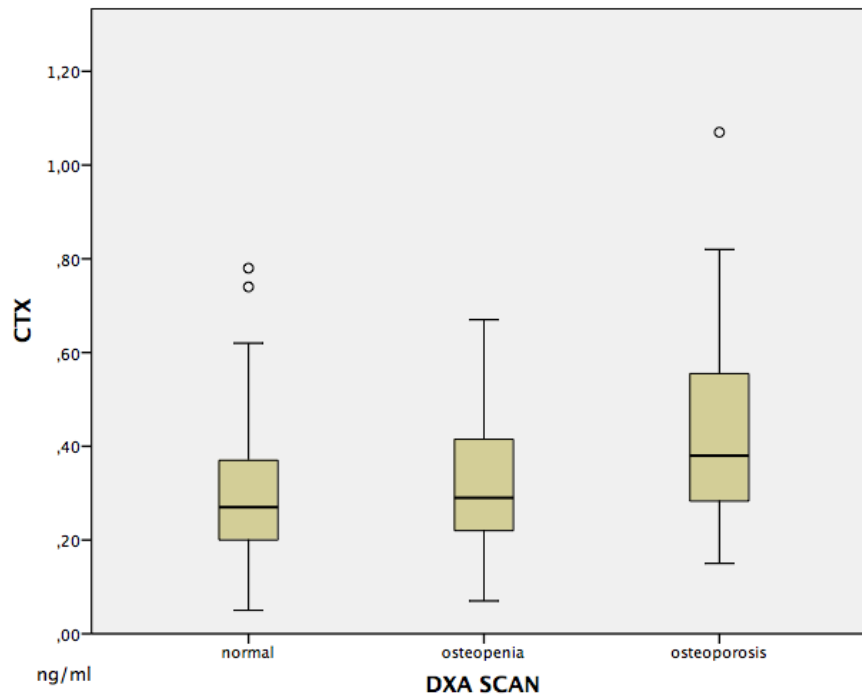


Figure 4A. Osteocalcin (OC) levels were higher in patients with osteoporosis compared to those without osteoporosis on DXA scan.

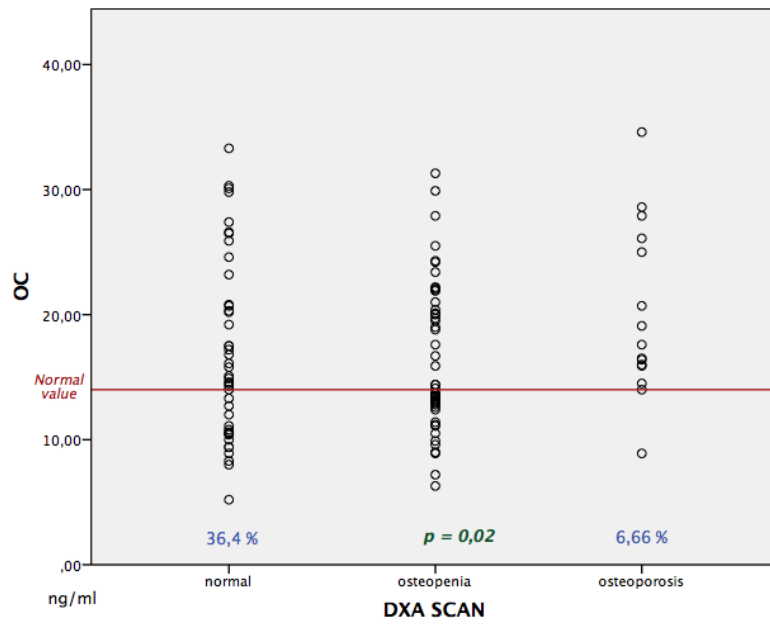


Figure 4B. Carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX-1) levels were higher in patients with osteoporosis compared to those without osteoporosis on DXA scan.

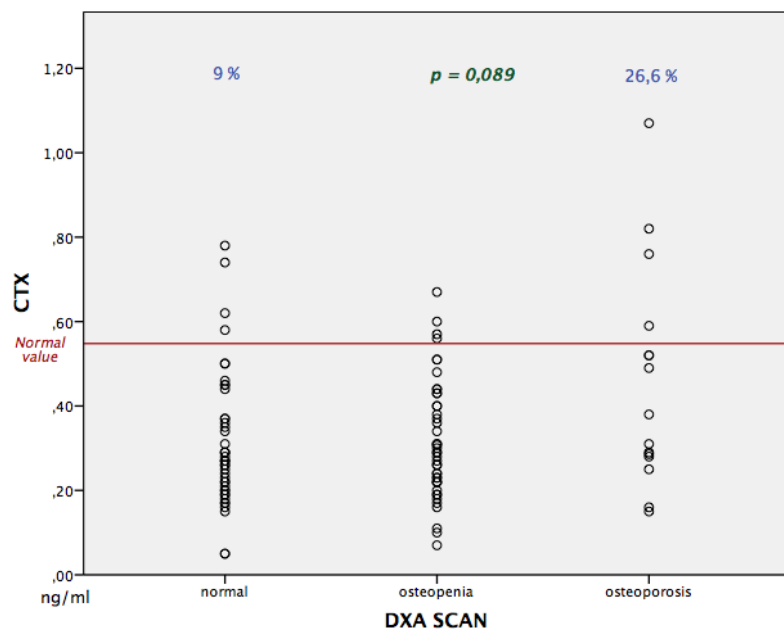
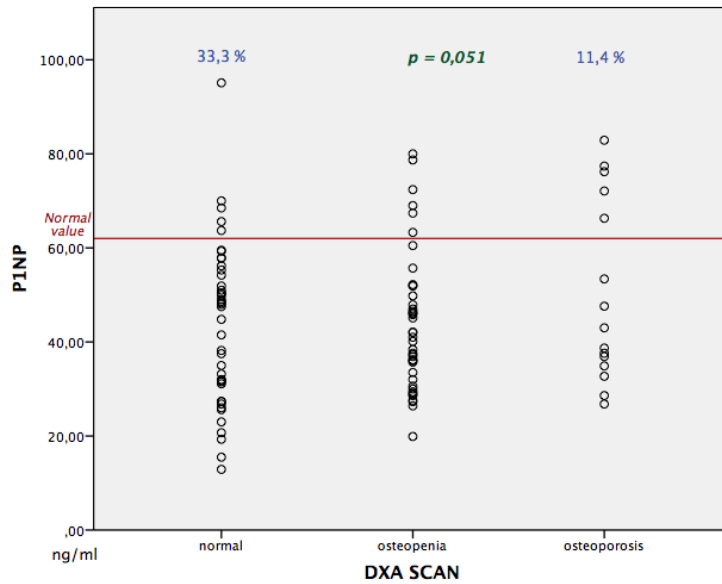


Figure 4C. N-terminal propeptide of procollagen type 1 (P1NP) levels were higher in patients with osteoporosis compared to those without osteoporosis on DXA scan.



Changes in subchondral bone, cartilage and synovial membrane in response to chiropractic manipulation in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits

Conesa-Buendía FM¹, Mediero A¹, Fujikawa R², Esbrit P¹, Mulero F³, Ortega-De Mues A²

¹Bone and Joint Research Unit, Institute of Health Research (IIS-Fundación Jiménez Díaz), ²Madrid College of Chiropractic-Real Centro Universitario Escorial-María Cristina, ³Molecular Imaging Unit, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain.

Keywords: chiropractic manipulation, osteoarthritis, fibrosis, inflammation, joint damage.

Address for correspondence: Dr. Arantxa Ortega-de Mues

Madrid College of Chiropractic
Real Centro Universitario Escorial-María Cristina
Paseo de los Alamillos, 2
28200 San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain
Phone: 34-91890 45 45 (ext. 211); Fax: 34-918906609
E-mail: aortega@rcumariacristina.com

Acknowledgments. This work was supported in part by grants from the Spanish Chiropractic Association (AEQ). AM was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III through the “Miguel Servet” program co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (CP15/00053 and PI16/00991). We thank Carlos Guillén for editing and proofreading this article.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest. AM has filed a patent on use of adenosine A2AR agonists to prevent prosthesis loosening (pending) and a separate patent on use of A2AR agonists and agents that increase adenosine levels to promote bone formation/regeneration.

Ethical Approval. All animal procedures were carried out according to the guidelines of European Union directives (2010/63/EU). All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Fundación Jiménez Díaz.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease characterized by injury of all joint tissues. Our previous study showed that in experimental osteoporosis, chiropractic manipulation (CM) exerts protective effects on bone. We assessed whether CM might ameliorate OA by improving subchondral bone sclerosis, cartilage integrity and synovitis. Male New-Zealand rabbits underwent knee surgery to induce OA by anterior cruciate ligament injury. CM was performed using the chiropractic instrument ActivatorV[®] 3 times/week for 8 weeks as follows: force 2 setting was applied onto the tibial tubercle of the rabbit right hind limb (TM-OA), whereas the corresponding left hind limb received a false manipulation (FM-OA) consisting of ActivatorV[®] firing in the air and slightly touching the tibial tubercle. After sacrifice, subchondral bone integrity was assessed in the tibiae by microCT and histology. Cartilage damage and synovitis were estimated by Mankin's and Krenn's scores and histological techniques. Bone mineral density and content, in subchondral cortical and trabecular bone decreased in OA rabbits compared to controls rabbits, being partially reversed in the TM-OA group. Trabecular parameters in TM-OA animals showed a significant improvement compared to FM-OA. RANKL, OPG, ALP and TRAP expression significantly decreased in TM-OA respect to FM-OA group at subchondral level. CM was associated with a lower Mankin's score in TM-OA cartilage with respect to FM-OA, presenting a higher Krenn's score and macrophage infiltrate than TM-OA rabbits. Also, higher pro-inflammatory, fibrotic and angiogenic marker expressions was observed in TM-OA. Our results suggest that CM may retard OA through a general improvement of joint tissues.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a chronic multifactorial disease that affects all anatomical structures of the joint, namely cartilage, subchondral bone and synovial membrane [1]. This disease affects about 15% of the population aged 25-75 years, and its prevalence significantly increases with age, affecting 70% of the population over 65 years [2].

OA has been considered a cartilage disorder, but the integrity of articular cartilage appears to depend on the mechanical properties of the underlying bone [3]. Several studies have recognized specific changes in the architecture and turnover of arthritic subchondral bone [4, 5]. In this sense, different molecular alterations associated with remodeling of the latter, e.g., in expression of nuclear factor ligand receptor kappa B (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), have been described [6, 7].

Experimental and clinical research indicate that osteoporotic changes in the subchondral bone could play a key role in the onset of OA [8]. In fact, recent studies show that osteoporosis (OP) induces cartilage injury in a rabbit model of combined OP and OA (OPOA) [9]. In this setting, the observed significant correlation between deterioration of the subchondral microstructure and cartilage damage indicates that changes in subchondral bone aggravate cartilage damage [10].

Currently, no effective pharmacotherapy is available for OA, and the treatment of these patients is based on established guidelines for keeping the structural conservation of the joints by correcting postures and avoiding joint overloads with the help of physical support [11]. Likewise, a good physical activity is recommended since mechanical stimulation can improve the initial stages of OA [11].

Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) has been proposed as a novel therapeutic alternative in OA [12]. By mechanisms still poorly understood, application of shock waves appears to have a beneficial effect on both chondrocytes and subchondral bone remodeling [13]. However, the intensity of the shock waves applied as well as the

duration and pattern of the treatment vary in different studies, which makes it difficult to analyze and compare the results obtained [14]. In fact, degenerative effects in joint tissue have been described when ESWT overdose is applied [15]. In this regard, low energy shock wave devices, such as ActivatorV Adjusting Instrument[®] (Activator Methods International, Phoenix, AZ) used for chiropractic manipulation (CM) [16] might be an alternative to ESWT in OA treatment. Compared to ESWT generators, the peak amplitude of the pressure waves generated by ActivatorV[®] is 20-fold smaller [17]. Previous studies have shown that a force input of 123 N generated by ActivatorV[®] at a setting of 1 directly on cells [17], or 79 N on polymer spinal tissue analog blocks [18], produce a maximal kinetic energy of 0.3 J, which is far below the energy required to produce tissue injury [19].

Recently, we reported that CM, using ActivatorV[®], induces an improvement in bone mineral density (BMD) and bone microarchitecture in an experimental rat model of OP [20]. Considering these previous findings and given the apparently important role of subchondral bone in cartilage damage in OA, we hypothesized that ActivatorV[®]-based CM might prevent the progression of OA through the improvement of subchondral bone.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Thirteen male New Zealand rabbits (12-13 weeks of age) (Granja San Bernardo, Pamplona, Spain), were included in the study. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the IIS-Fundación Jiménez Díaz, according to the European Union guidelines for decreasing animal pain. We complied with the 3R (“replace, reduce, and refine”) experimental design recommendation aimed to reduce the number of experimental animals [21]. Rabbits were placed in cages under

standard conditions (room temperature 20 ± 0.5 °C, relative humidity $55 \pm 5\%$, and illumination with a 12 h/12 h light/dark photoperiod), given food and water *ad libitum* and allowed to move without restriction.

Animal Procedures

After 2 weeks of adaptation to our facilities, OA was induced in both knees of each of 10 rabbits by anterior cruciate ligament section [22]. The remaining 3 rabbits were used as healthy controls. The surgery was performed under general anesthesia (intramuscular administration of 20 mg/ml xylazine (Rompun, Bayer, Kiel, Germany) and 50 mg/ml ketamine (Ketolar, Pfizer, Hameln, Germany) at 3:1 ratio), under aseptic conditions in the operating room. After 2 weeks of surgery, CM was performed using ActivatorV[®] at setting 2 with preload of 3.705 lb/inch spring rate applied onto the tibial tubercle of the rabbit right hind limb (true manipulation, TM) at a 90° angle from medial to lateral side [23]. The contralateral left hind limb received a false manipulation (FM) consisting of ActivatorV[®] firing in the air and gently touching the tibial tubercle. These procedures were repeated 3 times/week for 8 weeks. At the end of the treatments, animals were sacrificed by an intracardiac injection of 50 mg/kg pentobarbital (Tiobarbital, Braun medical, Barcelona, Spain). Femoral condyles, tibial plateaus and synovial membranes were collected for further histological, immunohistochemical and Western blot analysis or microstructural studies.

Microcomputerized tomography (microCT) analysis of rabbit tibiae

Left and right rabbit tibiae were scanned using a high-resolution microCT system (GE eXplore Locus ICT scanner, GE Healthcare, London, Canada). The X-ray tube settings were 80 kV of energy and 450 μ A of current. The microCT image acquisition consisted of 400 projections collected in one full rotation of the gantry. The resulting raw

data were reconstructed using a filtered back-projection algorithm to a final image with a resolution of 45 μm in all three spatial dimensions. Images obtained with an isotropic voxel size of 46 μm and 0.5 mm square were analyzed. For subchondral cortical bone, regions of interest (ROIs) analyzed, was studied starting in the cortical bone edge until the appearance of the first trabeculae, corresponded to approximately 20 slides per sample. For subchondral trabecular bone, a characteristic region in medial posterolateral position was selected [24]. The reconstructed images of both subchondral cortical and trabecular bone were analyzed using MicroView software, version 2.2 with Advanced Bone Analysis Plus (GE Healthcare). Both BMD and bone mineral content (BMC) were evaluated in subchondral cortical and trabecular bone. Moreover, trabecular parameters namely bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N) and trabecular separation (Tb. S) were calculated.

Macroscopic tissue analysis

Degenerative changes of medial and lateral femoral condyles in the cartilage were evaluated macroscopically and classified into four grades: 0= intact surface, 1=irregular surface; 2= surface fibrillation, 3= erosion according to the modified Lavery's grading system [25].

Cartilage histopathological alterations

After microCT was performed, left and right tibiae were decalcified with 10% EDTA, pH 7.7, solution during 4 months. Thereafter, the tibiae were cleaved in a sagittal plane along the central portion of the articular surface of each medial tibial plate corresponding to the weight-bearing area, and subsequently embedded in paraffin. Five- μm tibial sections were stained with safranin O-fast green for histological analysis. Stained sections were evaluated by two independent observers using a modified Mankin's

grading score system which analyses four different parameters with a total score up to 21: structure (0-8), proteoglycan staining (0-6), loss of chondrocytes (0-4), and clone formation (0-3) [26]. The final score of each sample was the average of two independent scores.

Histological synovitis grading

Synovial membranes from both knees of each rabbit were sectioned (5 μ m) and stained with hematoxylin and eosin. Synovitis was evaluated according to the Krenn's score [27], assessing lining hyperplasia, activation of synovial stroma related to fibrosis, and tissue infiltration. Each item was evaluated by two blinded observers using a subscale of 0-3 points, where 0 indicated absence, 1 mild, 2 intermediate and 3 strong evidence of synovitis. The total score was obtained from the sum of partial grades with a maximum total score of 9.

Immunohistochemical localization of RANKL, OPG and ALP

The distribution pattern of cells expressing RANKL, OPG and alkaline phosphatase (ALP) was also assessed in paraffin-embedded tibia sections. Briefly, after deparaffination, sections were rehydrated in graded ethanol and incubated in 4% bovine serum albumin (BSA) and 3% sheep serum to block unspecific immunobinding. Mouse monoclonal antibodies against RANKL, ALP (Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany) or OPG (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (at 1:200 dilution) were added overnight, at 4 °C. This was followed by subsequent incubation with corresponding 1:200 biotinylated goat anti-mouse IgG (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), at 1:200 dilution, and peroxidase ABC with 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride as chromogen (Dako, Golstrup, Denmark). Sections were counterstained with hematoxylin, mounted in DPX medium (VWR

International, Leuven, Belgium) and photographed using an automated iScan Coreo slide scanner (Ventana Medical Systems, Arizona, USA). Three random areas per slide were selected blinded to group assignment and quantified with Image J software. Results are expressed as a percentage of positive stained area in relation to the total tissue area. The negative controls involved incubation with an IgG isotype.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining

To verify the presence of osteoclasts, TRAP staining was performed. In brief, after deparaffinization and 0.1 M acetate buffer pH 5 washing, sections were incubated with TRAP buffer consisting of: 0.1 M acetate buffer pH 5, 0.3 M sodium tartrate buffer, naphthol AS-MX phosphate (10 mg/ml), 0.1% Triton X-100 and fast red violet LB staining reagent (0.3 mg/ml) for 30 minutes. Samples were counterstained with fast green reagent for 45 seconds, and mounted in DPX (VWR International Ltd, Leuven, Belgium). TRAP-positive cells with three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts in 5 random high-power fields ($\times 400$, bone area 0.04 mm^2) per sample in the subchondral bone of each rabbit. Total osteoclasts were expressed as the mean of TRAP positive cells per mm^2 in each experimental group.

Immunohistochemistry of rabbit macrophages and endothelial cells in synovial membrane

Macrophages were identified in the synovial membrane, using a rabbit monoclonal anti-rabbit macrophage antibody (RAM11; Dako, Glostrup, Denmark), according to a previously described protocol [28]; whereas endothelial cells were identified with CD31 antibody (Abcam, Cambridge, UK), as reported [29]. To evaluate both RAM-11 and CD31 positive immune reactivity, sections were photographed using an automated iScan Coreo slide scanner and five random areas per slide were selected

blinded to group assignment and quantified with Image J software. The results were expressed as percentage of positive area in relation to the total tissue area. An IgG isotype was used as negative control.

Western blot

Proteins from synovial membranes were extracted with mechanical disintegration in RIPA buffer, pH 8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), supplemented with protease inhibitor cocktail P8340 (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitor cocktail Set II (Calbiochem, La Jolla, CA). Protein content was determined by bicinchoninic Acid (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Protein extracts (25-60 μ g) were separated on 10-15% polyacrylamide-SDS gels under reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred onto nitrocellulose membranes, followed by blocking with 3% BSA in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and 150 mM NaCl with 0.05% Tween-20. After overnight incubation with polyclonal anti-rabbit VEGF-164 (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), monoclonal anti-rabbit MMP3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal anti-rabbit IL1- β (1:150, Cloud-Clone, Houston TX), polyclonal anti-rabbit TNF α (1:200, Cloud-Clone) and monoclonal anti-rabbit COX-2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), at 4 °C, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), or anti-guinea pig IgG (Abcam, Cambridge, UK) for primary IL1- β and TNF α antibodies, was added for 1 h, at room temperature. As loading control, anti β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used. Protein bands were developed with Luminata CrescendoTM Western HRP detection (Millipore, Billerica, MA), and analyzed by densitometric scanning using Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) throughout the text. We used non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups. Each limb was analyzed as an independent sample for the studies. $P < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPadPrism V 5.01 software (GraphPad, La Jolla, CA).

RESULTS

CM improves microstructural parameters in OA-subchondral bone

A significant weight loss in OA group compared to control animals (3.9 ± 0.4 kg vs 4.8 ± 0.3 kg vs. respectively; $p < 0.05$) was observed at time of sacrifice. This decrease was associated to subchondral bone mass loss in the former rabbits as confirmed by microCT. Thus, both BMD and BMC in cortical and trabecular subchondral bone were lower in FM-OA rabbits, when compared to control animals (Table 1). ActivatorV[®] adjustment (TM-OA group) produced an increase in BMD and BMC at both skeletal locations, without reaching the corresponding values in control animals (Table 1). In addition, in subchondral trabecular bone, we found a significant decrease in BV/TV in FM-OA rabbits compared to healthy control group that was partially abrogated by CM (TM-OA group) (Table 1). Consistent with these results, Tb.N, Tb.S and Tb. Th values were decreased in the FM-OA group, compared to those in control group, and showed a significant improvement, except for Tb.Th. values, in the TM-OA group (Table 1).

CM counteracts the increase of subchondral bone remodelling in OA rabbits

Bone remodeling markers were assessed in subchondral bone in all groups studied. Subchondral bone formation assayed by ALP staining increased significantly in the subchondral bone of FM-OA rabbits, by regards to healthy controls, and showed a tendency to normalize in the TM-OA group (Fig. 1 A). Moreover, a similar trend of changes in subchondral bone degradation, as determined by TRAP staining of osteoclasts, was revealed in these three groups of rabbits (Fig.1B).

Since the RANKL/OPG system has a key role in bone remodelling [30], and it has previously been found to be dysregulated in the subchondral bone of OA rabbits [10, 11], we here explored possible changes in this system induced by CM. In the subchondral bone of the tibiae of FM-OA animals, a significant increase in RANKL immunostaining was observed compared to healthy rabbits (Fig. 2A); but it was lower in the TM-OA group (Fig.2A). An opposite pattern of changes was found for OPG staining in the subchondral bone of these groups of rabbits (Fig. 2A). As a consequence, a significant increase of the RANKL/OPG ratio was observed in the FM-OA rabbit tibiae, compared to that in healthy controls, which normalized in the TM-OA group (Fig.2B).

CM modifies cartilage and synovial membrane damage produced by OA in rabbits

We next assessed whether CM was able to modify the damage associated to cartilage in this model of OA, using a macroscopical grading in femoral condyles in the rabbits studied. Morphological changes such as discoloration and erosion were visible in the medial and lateral femoral condyles in OA rabbits, being more pronounced in the medial condyle (Fig. 3A). However, the severity of damage was significantly lower in the TM-OA group, compared to the FM-OA group (Fig. 3B). Furthermore, cartilage degradation of tibiae was evaluated. As expected, OA rabbit tibiae showed higher Mankin

scores than control rabbits, but this increase was less pronounced in the TM-OA group (Fig. 3C-D).

The Krenn score analysis revealed characteristic osteoarthritic lesions in the OA rabbit synovial membrane, including evident lining thickening, an increment in stromal cellularity and presence of infiltrating cells in the synovial stroma (Fig. 4). Interestingly, the FM-OA group showed a significantly higher Krenn score than the TM-OA group (Fig. 4A), mainly at the expense of a decrease in inflammatory cells in the latter group (Fig. 4B).

CM affects macrophage infiltration in synovial membrane of OA rabbits

Inflammatory infiltration in OA rabbit synovial membrane was further analyzed by studying the presence of macrophages. Thus, whereas barely staining of RAM11 was observed in healthy control animals, both FM-OA and TM-OA groups showed a distinct staining in both the synovial stroma and intimal layer (Fig. 5A). However, quantification of tissue staining revealed a significant decrease of intensity in the synovial membrane of TM-OA group in comparison to FM-OA group (Fig. 5B).

We next explored whether CM might be able to modify the expression of pro-inflammatory cytokines, namely IL1- β , TNF α and COX-2, in the synovial membrane of OA rabbits. Western blot revealed that OA induced a marked increase of all these pro-inflammatory mediators in comparison to control animals, but this increase was significantly attenuated in the TM-OA group (Fig. 6).

CM effects on synovial fibrosis and angiogenesis of OA rabbits

We also investigated the putative effects of CM on extracellular matrix formation and remodelling in synovial membrane of OA rabbits. We found an enhanced protein

expression of MMP-3 and Col VI in OA animals compared to the control group, which was significantly lower in the TM-OA group than in the FM-OA group (Fig. 7A and B).

Since inflammation and angiogenesis in the synovium are closely integrated processes in the pathogenesis of OA [31], we also determined whether CM could affect angiogenesis in this OA rabbit tissue.

In OA rabbits, we found that synovial membranes exhibited an increased protein expression of VEGF -an angiogenic factor- in comparison to controls; this increase was more evident in the FM-OA group (Fig. 7C). In parallel, the presence of vessels in the synovial tissue was studied by CD31 immunostaining. A significant increase of CD31-positivity was revealed in both OA groups compared to control animals, but it was more dramatic in FM-OA rabbits (Fig.7D).

DISCUSSION

The results of the present study suggest that CM could be an effective alternative treatment of OA. The observed effect of CM on subchondral bone remodeling supports the association between this remodeling and cartilage tissue integrity in the knee of OA rabbits. Moreover, CM positively affected histological changes of the synovial membrane, including inflammation and angiogenesis as well as changes in the structure of the extracellular matrix associated with OA in these animals.

Associated with OA, it has been described that the loss of mobility and limb function leads to bone demineralization [32]. In the present rabbit model, demineralization of the subchondral bone associated with OA was reversed by CM, in agreement with our previous findings in a rat osteoporosis model [20]. Similar results have previously been reported by using EWST in postmenopausal women with lumbar and femoral OP [33]. In the latter study, it was hypothesized that EWST stimulation could induce the expression and secretion of growth factors, which would enhance the activity

of osteoblasts and/or inhibit the differentiation of osteoclasts and their resorptive effect on bone [33]. In the same line, our study demonstrates a CM-related reduction of osteoclasts together with a decreased RANKL/OPG ratio in OA rabbit subchondral bone. In fact, the latter ratio has been suggested to be a possible target in OA therapy [34]. Moreover, the results obtained by analyzing ALP positivity, as a marker of osteoblastogenic activity, support the notion that the beneficial effect of CM on subchondral bone remodeling is also exerted by targeting osteoblasts.

Regarding the changes in microarchitecture of the subchondral bone in the present experimental model, a clear difference was observed in the subchondral bone of TM-OA rabbits, namely an increase in Tb.N with the consequent reduction in Th.S, compared to that of the FM-OA group, in which Tb.N was diminished compared to healthy animals. Similar results were described in femoral trabecular bone of osteoporotic rats submitted to the similar ActivatorV® treatment [20]. In contrast to the aforementioned work, though, in the present OA model the decreased Tb.Th in the subchondral tibiae did not improve by CM treatment. This apparent inefficiency of CM on Tb.Th in this model could be due to the fact that, at least in rodents, Tb.Th is a parameter that tends to be overestimated due to the algorithm and 3D digital interpretation performed by the microCT software [35, 36]. A large voxel size as it is the case of the rabbit, imposes trabecular limit identification to measure trabecular thickness since the images are pixelated and the surface expands slightly, resulting in an inaccurate measure of the thickness of the binarized surface [36]. Moreover, the anatomical differences between the rabbit and rat tibia is another factor to be considered when interpreting the differences of microCT results observed in the trabecular bone of both species [37]. Further research is needed to clarify this issue. In any case, the observed increase in the number of trabeculae induced by CM in OA rabbits could compensate the reduction in their thickness, producing a general improvement in the mechanical properties of the subchondral bone

in this setting. In this regard, some studies have reported that subchondral bone provides structural support to the overlying articular cartilage and plays an important role in the development of cartilage lesions associated to OA [1]. Indeed, the improvement of subchondral bone by the administration of anti-resorptive agents such as alendronate or bisphosphonates have shown to prevent cartilage damage progression in OA [38]. In our rabbit model, improvement in subchondral bone after CM was also associated with less cartilage deterioration, analyzed both at the macroscopic level in the femur, and at the microscopic level by Mankin's score in the tibiae of OA rabbits. This chondroprotective effect associated with ActivatorV® treatment is coherent with previous data using ESWT in rats [39].

The true mechanisms whereby CM could exert these beneficial effects on damaged cartilage are unknown. It has been suggested that likely candidates as signaling molecules for a cross-talk between subchondral bone and articular cartilage in OA may include bone remodeling products and osteoclast and osteoblast activation factors targeting chondrocytes [41]. Previous studies have also shown that the antiresorptive and chondroprotective effects of ESWT might be due to changes in mechanotransduction inducing different biological responses, such as anti-inflammatory processes, promotion of cell proliferation and neovascularization, favoring tissue regeneration and repair [40]. In addition, based on studies carried out with the ActivatorV® in spinal manipulative therapy, it is been speculated that the mechanical impulse generated by this device and the associated joint movement could modulate the entry of sensory afferences (mechanoreceptors) to the central nervous system with subsequent modulation of muscle tension [19]. This muscular tension could achieve considerable articular reconditioning, relieving the overload to which the knee is exposed, and thus improving the status of the damaged cartilage in the context of OA.

Possible joint structure improvement triggered by CM might also be related to the parallel decreased synovitis induced by this treatment in OA rabbits, as manifested by changes in macrophage infiltrate associated with a lower expression of pro-inflammatory cytokines in synovial membrane. In this regard, it has been proposed that components of the extracellular matrix could leak from damaged cartilage into the synovial fluid and activate synovial macrophages [42]. This activation would lead to the release of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases, generating a vicious circle of inflammation and cartilage breakdown [42]. In addition, recent data have shown that activated macrophages in the synovial membrane promote angiogenesis by production of growth factors and chemokines promoting endothelial cell adhesion, receptor expression and neo-vascularization [43]. In this sense, CM was here found to reduce de novo vascularization of synovial membrane associated with a lower presence of inflammatory cells and a reduced deterioration of articular cartilage in the present OA model. Recent studies have also shown that cytokines such as IL1- β and TNF- α produced by activated synoviocytes regulate the expression of metalloproteinases [44]. Our findings demonstrate that the observed elevated collagen VI and MMP-3 in the synovium of OA rabbits were significantly diminished by CM. As a note of interest in this respect, a recent study has shown that ESWT protected cartilage from biomechanical damage and prevented subchondral sclerosis through regulation of metalloproteinases in both cartilage and subchondral bone in another model of OA in rabbits [45].

Taken together, our findings suggest that CM contributes to maintaining the synovial membrane structure through the combined reduction of metalloproteinases, angiogenesis and inflammatory infiltration, resulting in an improvement of the damaged joint in OA rabbits.

In conclusion, the present experimental study in rabbits suggests that CM may retard the progression of OA through an improvement of both subchondral bone remodeling and cartilage damage associated with an ameliorated synovial damage.

REFERENCES

1. Sellam J, Herrero-Beaumont G, Berenbaum F (2009) Osteoarthritis: pathogenesis, clinical aspects and diagnosis. In *EularCompedium on Rheumatic Diseases*. Edited by Bijlsma JWJ, Burmester GR, daSilva JAP, Faarvang KL, Hachulla E, Mariette X. London, UK: BMJ Group 444-463.
2. Guilak F (2011) Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25: 815–823.
3. Muraoka T, Hagino H, Okano T, Enokida M, Teshima R. (2007) Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56: 3366-74.
4. Chappard C, Peyrin F, Bonnassie A, Lemineur G, Brunet-Imbault B, Lespessailles E, Benhamou CL (2006) Subchondral bone micro-architectural alterations in osteoarthritis: a synchrotron micro-computed tomography study. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 215-223.
5. Messent EA, Ward RJ, Tonkin CJ, Buckland-Wright C (2005) Cancellous bone differences between knees with early, definite and advanced joint space loss; a comparative quantitative macroradiographic study. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 39-47.
6. Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, Henriksen K, Alexandersen P, Pastoureau P, Altman RD, Christiansen C (2008) Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 16: 638-646.

7. Kwan Tat S, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J (2008) The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clin Exp Rheumatol* 26:295-304.
8. Cake MA, Appleyard RC, Read RA, Smith MM, Murrell GA, Ghosh P (2005) Ovariectomy alters the structural and biomechanical properties of ovine femoro-tibial articular cartilage and increases cartilage iNOS. *Osteoarthritis Cartilage* 13:1066-1075
9. Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, Henriksen K, Qvist P, Christiansen C, Tankó LB, Karsdal MA (2006) Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation. *Arthritis Rheum* 54:2441-2451.
10. Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G (2011) Improving subchondral bone integrity reduces progression of cartilage damage in experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage* 19:1228-36.
11. Anwer S, Alghadir A, Zafar H, Brismée JM (2018) Effects of orthopaedic manual therapy in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy*: 104: 264 – 276.
12. Mittermayr R, Antonic V, Hartinger J, Kaufmann H, Redl H, Teot L, Stojadinovic A, Schaden W (2012) Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy. *Wound Repair Regen* 20: 456-465.
13. Wang CJ, Sun YC, Siu KK, Wu CT (2013) Extracorporeal shockwave therapy shows site-specific effects in osteoarthritis of the knee in rats. *J Surg Res* 183:612-619.
14. Qiaodan Ji, Pu Wang, Chengqi He (2016) Extracorporeal shockwave therapy as a novel and potential treatment for degenerative cartilage and bone disease:

- Osteoarthritis. A qualitative analysis of the literature. *Prog Biophys Mol Biol* 121:255-265.
15. Wang CJ, Hsu SL, Weng LH, Sun YC, Wang FS (2013) Extracorporeal shockwave therapy shows a number of treatment related chondroprotective effect in osteoarthritis of the knee in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 28: 14-44.
 16. Song XJ, Gan Q, Cao JL, Wang ZB, Rupert RL (2006). Spinal manipulation reduces pain and hyperalgesia after lumbar intervertebral foramen inflammation in the rat. *J Manipulative Physiol Ther* 29: 5-13.
 17. Liebschner MA, Chun K, Kim N, Ehni B (2014) In vitro biochemical evaluation of single impulse and repetitive mechanical shock wave devices utilized for spinal manipulative therapy. *Ann Biomed Eng* 42: 2524-2536.
 18. Colloca CJ, Keller TS, Black P, Normand MC, Harrison DE, Harrison DD (2005) Comparison of mechanical force of manually assisted chiropractic adjusting instruments. *J Manipulative Physiol Ther* 28: 414-422.
 19. Fuhr AW, Smith DB (1986) Accuracy of piezoelectric accelerometers measuring displacement of a spinal adjusting instrument. *J Manipulative Physiol Ther* 9:15-21.
 20. López-Herradón A, Fujikawa R, Gómez-Marín M, Stedile-Lovatel JP, Mulero F, Ardura JA, Ruiz P, Muñoz I, Esbrit P, Mahíllo-Fernández I, Ortega-de Mues A (2017) Impact of Chiropractic Manipulation on Bone and Skeletal Muscle of Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 101:519-529.
 21. Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen and Co. Ltd, London.
 22. Li F, Yin Z, Wu H, Qin Z, Li Z, Qiu Y (2016). Section of the anterior cruciate ligament in the rabbit as animal model for osteoarthritis progression. *International Orthopaedics* 40: 407–416.

23. Trierweiler J, Gottert DN, Gehlen G (2012) Evaluation of mechanical allodynia in an animal immobilization model using the von Frey method. *J. Manipulative Physiol. Ther.*35:18–25.
24. Serink RT, Nachemson A and Hansson G (1977) The effect of impact loading on rabbit knee joints. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 48:250-262.
25. Lavery S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18 Suppl 3:S53-65.
26. Tiraloche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole AR and Lavery S (2005) Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52:1118-1128.
27. Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A (2002) Grading of chronic synovitis—a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* 198:317–25.
28. Larrañaga-Vera A, Lamuedra A, Pérez-Baos S, Prieto-Potin I, Peña L, Herrero-Beaumont G, Largo R (2017) Increased synovial lipodystrophy induced by high fat diet aggravates synovitis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 19:264-277.
29. Naredo E, Medina JP, Pérez-Baos S, Mediero A, Herrero-Beaumont G, Largo R (2018) Validation of Musculoskeletal Ultrasound in the Assessment of Experimental Gout Synovitis. *Ultrasound Med Biol* 44:1516-1524.
30. Pilichou A, Papassotiriou I, Michalakakou K, Fessatou S, Fandridis E, Papachristou G, Terpos E. (2008) High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Clinical Biochemistry* 41:746-774.

31. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF (2007) Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15:743-751.
32. Hamdy RC, Krishnaswamy G, Cancellaro V, Whalen K and Harvill L (1993) Changes in bone mineral content and density after stroke. *Am J Phys Med Rehabil* 72: 88-191.
33. Shi L, Gao F, Sun W, Wang B, Guo W, Cheng L, Li Z, Wang W (2017) Short-term effects of extracorporeal shock wave therapy on bone mineral density in postmenopausal osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 28: 2945-2953.
34. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J (2009) New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target?. *Keio J Med* 58:29-40.
35. Longo AB, Salmon PL, Ward, WE (2017) Comparison of ex vivo and in vivo micro-computed tomography of rat tibia at different scanning settings. *J Orthop Res* 35: 1690-1698.
36. Christiansen BA (2016) Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice. *Bone Rep* 5:136-140.
37. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR (2011) Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med* 61:76-85.
38. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong LT (2004) The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 50:1193-206.

39. Wang CJ, Cheng JH, Chou SL, Chen JH, Huang CY (2017) Changes of articular cartilage and subchondral bone after extracorporeal shockwave therapy in osteoarthritis of the knee. *Int J Med Sci* 14:213-223.
40. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, Yang LC (2003) Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *J Orthop Res* 21:984-989.
41. Pan J, Wang B, Li W, Zhou X, Scherr T, Yang Y, Price C, Wang L (2012) Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone* 51:212-217.
42. Berkelaar MHM, Korthagen NM, Jansen G, van Spil WE (2018) Synovial Macrophages: Potential Key Modulators of Cartilage Damage, Osteophyte Formation and Pain in Knee Osteoarthritis. *J Rheum Dis Treat* 4:059.
43. Szekanecz Z, Koch AE (2008) Vascular involvement in rheumatic diseases: “vascular rheumatology”. *Arthritis Res Ther* 10:224.
44. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39:237-246.
45. Wang P, Liu C, Yang XT, Wei XF, Zhou YJ, Yang L, He CQ (2014) Effect of extracorporeal shock wave therapy on cartilage and subchondral bone remodeling in rabbits with ACLT-induced osteoarthritis. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban* 45:120-125.

FIGURE LEGEND

Fig. 1 Immunohistochemical evaluation of ALP and TRAP in rabbit subchondral tibia Immunohistochemistry of ALP (A) and TRAP (B) was performed on paraffin-embedded samples of the subchondral tibia from each group of rabbits as described in the text. Magnification, x10, scale: 100 μ m. Densitometry values of each type of immunostaining are also shown. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

Fig. 2 Immunohistochemical analysis of RANKL and OPG in rabbit subchondral tibia (A) Immunohistochemistry of RANKL and OPG was performed on paraffin-embedded samples of the subchondral tibia from each group of rabbits as described in the text. Magnification, x10, scale: 100 μ m. Corresponding densitometry values are also shown. (B) RANKL/OPG ratio in the subchondral bone of each rabbit group studied. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

Fig. 3 Macroscopic and microscopic damage analysis on the femoral and tibia cartilage samples from each group of rabbits studies (A) Representative images of femoral cartilages of each group tested. The erosive aspect and brilliance, as well as the presence of osteophytes or irregularities were assessed in the cartilage tissue. The

quantitative results are shown in the bar graphic. **(B)** Tibia samples were immunostained with safranin and evaluated by Mankin's score. Damage was evaluated according to the following parameters: safranin loss (proteoglycans loss), tissue erosion, chondrocytes organization or clone formation and vascular infiltrate. Mankin's values are shown in the corresponding bar graphic. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

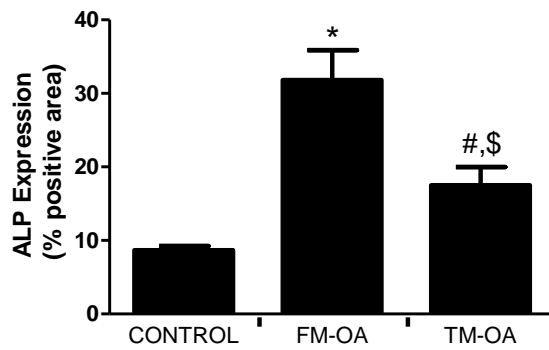
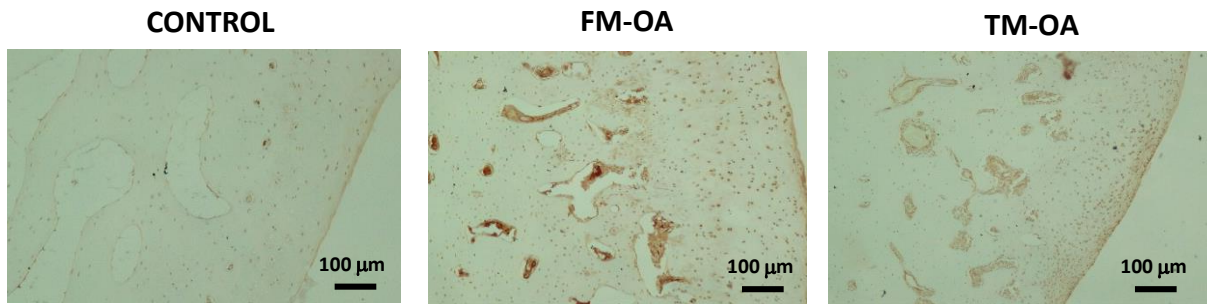
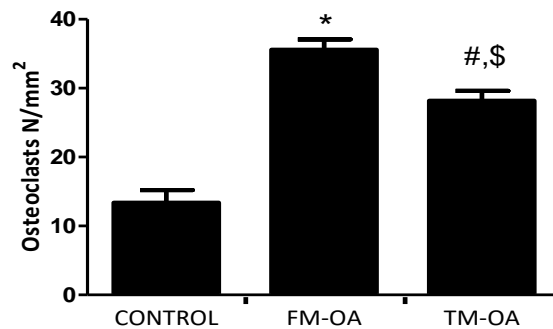
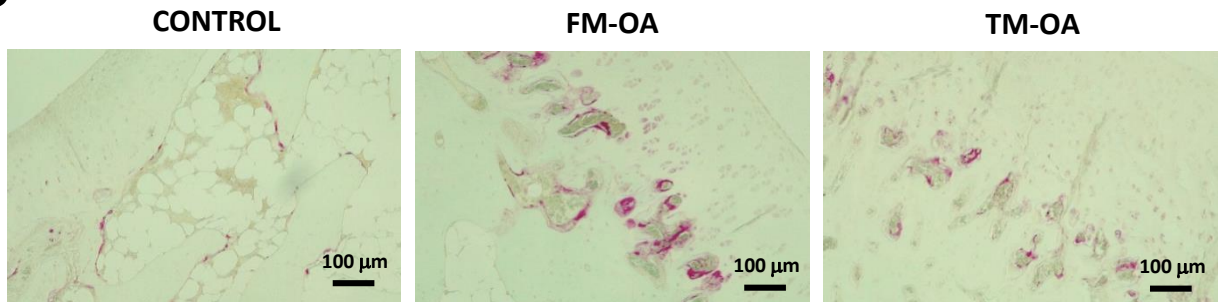
Fig. 4 CM affects synovitis in OA rabbits (A) Representative sections of synovium stained with hematoxylin and eosin. Magnification: x4, scale: 250 μ m. Global synovitis score quantification according to Krenn's score is shown. **(B)** Changes in different parameters analyzed separately according to Krenn's score. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

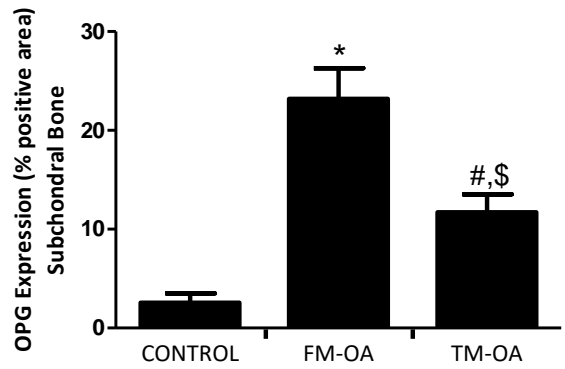
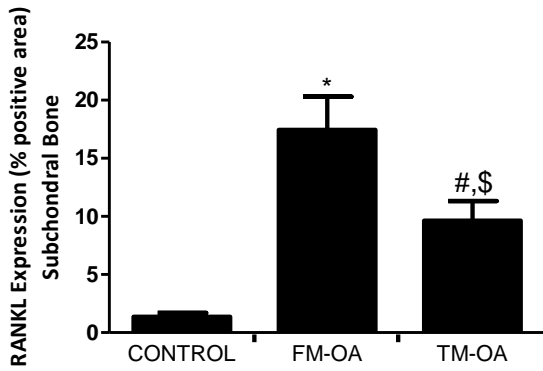
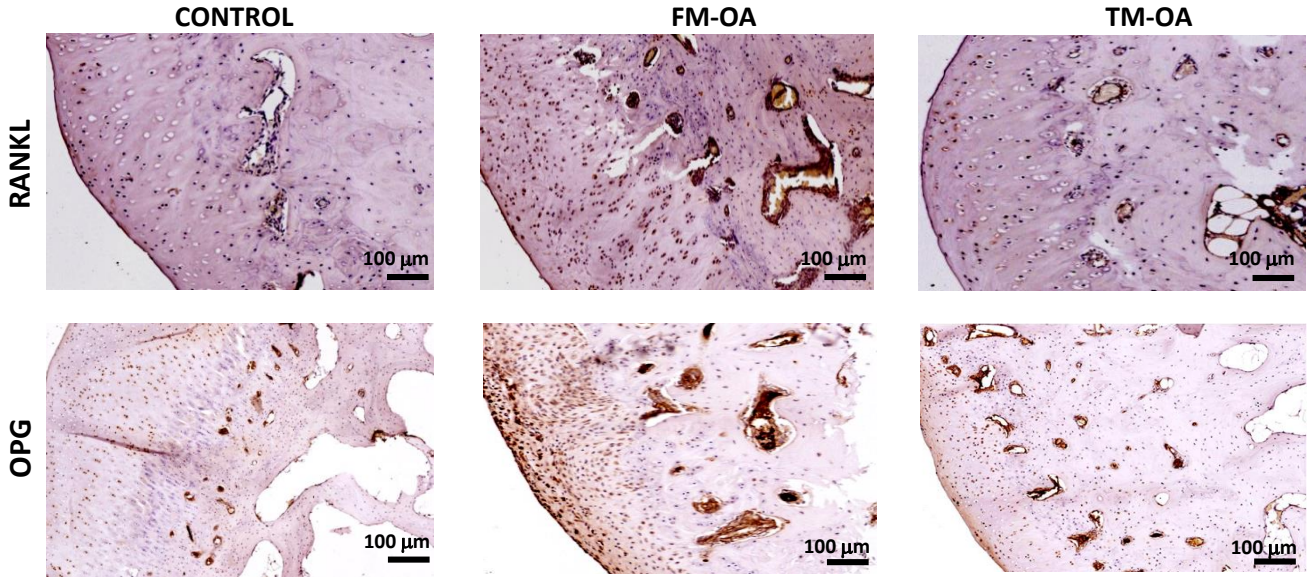
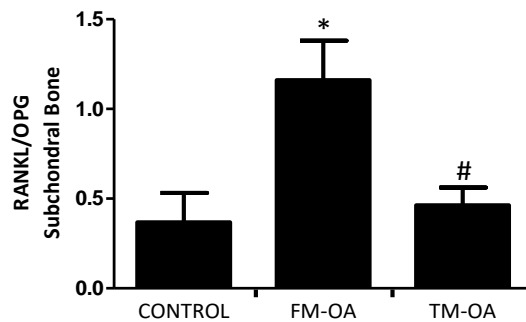
Fig. 5 Changes in cellular infiltrate in the synovial membrane of OA rabbits. (A) Immunohistochemistry of representative synovium sections from each rabbit group studied, using anti-rabbit macrophage antibody RAM11. Magnification: 10x (top images), 40x (bottom images). Scale: 100 μ m (top images), 25 μ m (bottom images). **(B)** Corresponding densitometry analysis of RAM11 staining in the synovium of each group of animals. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric

Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

Fig. 6 Changes in several proinflammatory mediators in synovial membrane of OA rabbits COX-2 (A), TNF α (B), immature form of IL1- β (C) and active IL1- β protein expression in synovial membranes from each of the experimental groups studied by western blot. Data are relative intensities of the protein signal normalized to that of α -actin for each experimental group, compared to the corresponding value in control (expressed as n-fold). Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10). *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

Fig. 7 Protein expression of fibrotic and angiogenic markers in synovial membrane of OA rabbits MMP-3 (A), COL VI (B) and VEGF-164 (C) protein expression in synovial membranes from each animal group studied by western blot. Data are relative intensities of the protein signal normalized to that of α -actin for each experimental group, compared to the corresponding value in control (expressed as n-fold). (D) Immunohistochemistry of CD31 in representative synovium sections from each rabbit group studied. Magnification: 10x, scale: 100 μ m. Quantitative results of corresponding densitometry analysis are shown in the bar graphic. Values are mean \pm SD (Control, n= 6; FM-OA, n= 10; and TM-OA, n = 10) *, \$ p <0.05 vs Control; #p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using non-parametric Kruskal-Wallis test with a post-hoc correction (Dunn's procedure) for comparison between multiple groups, and Mann-Whitney U test for comparison between two groups.

A**B****Figure 1**

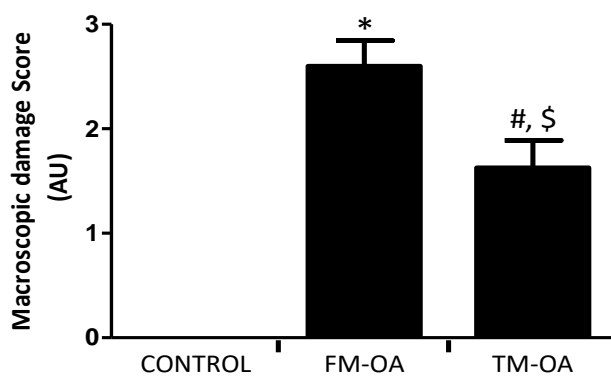
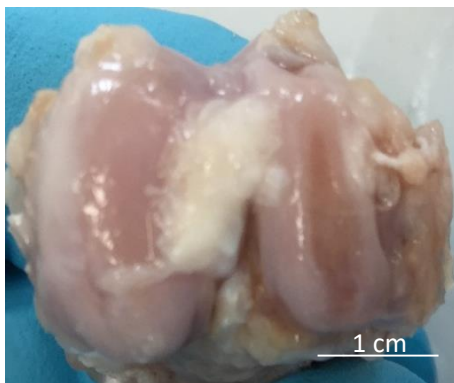
A**B****Figure 2**

A

CONTROL

FM-OA

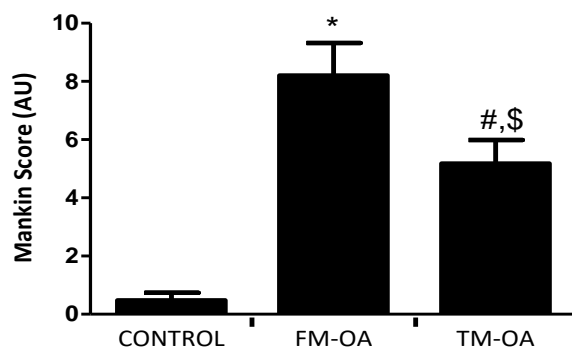
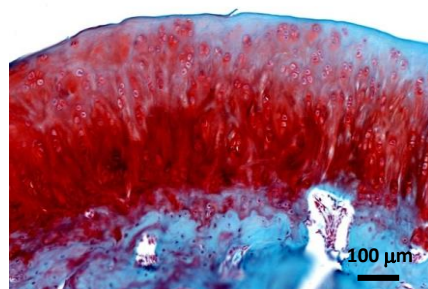
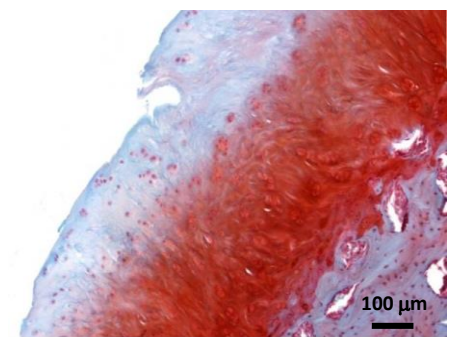
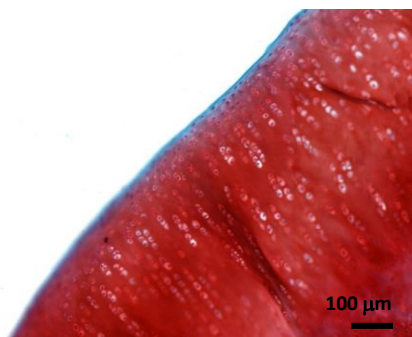
TM-OA

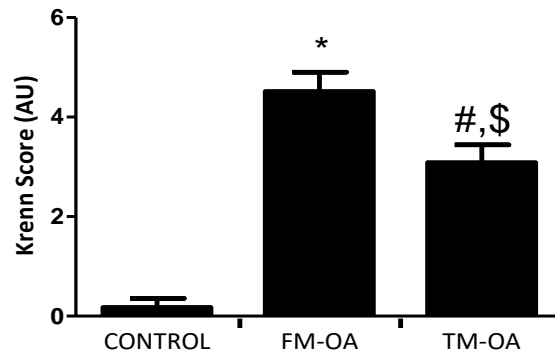
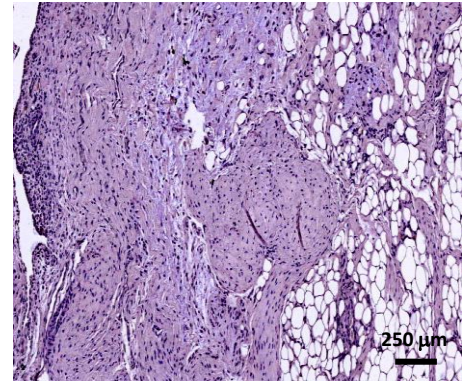
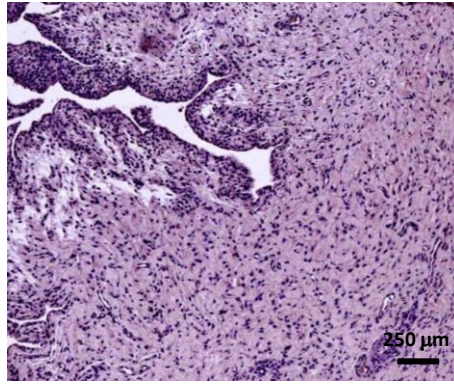
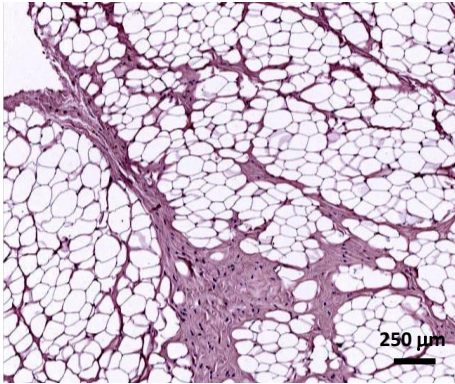
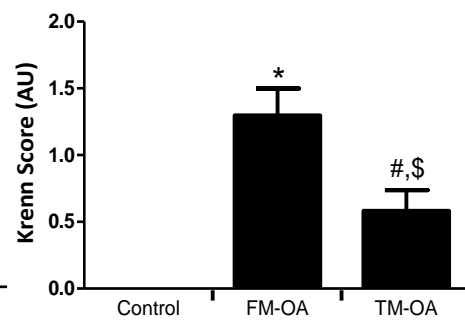
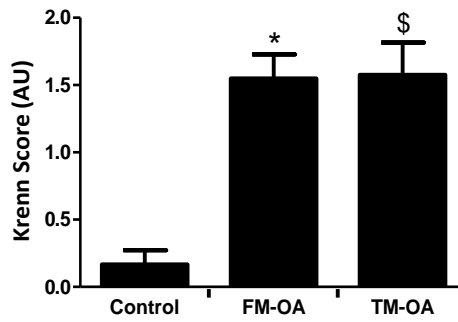
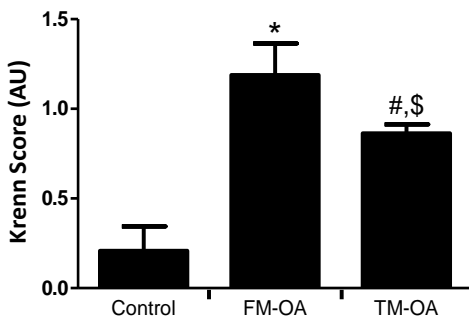
**B**

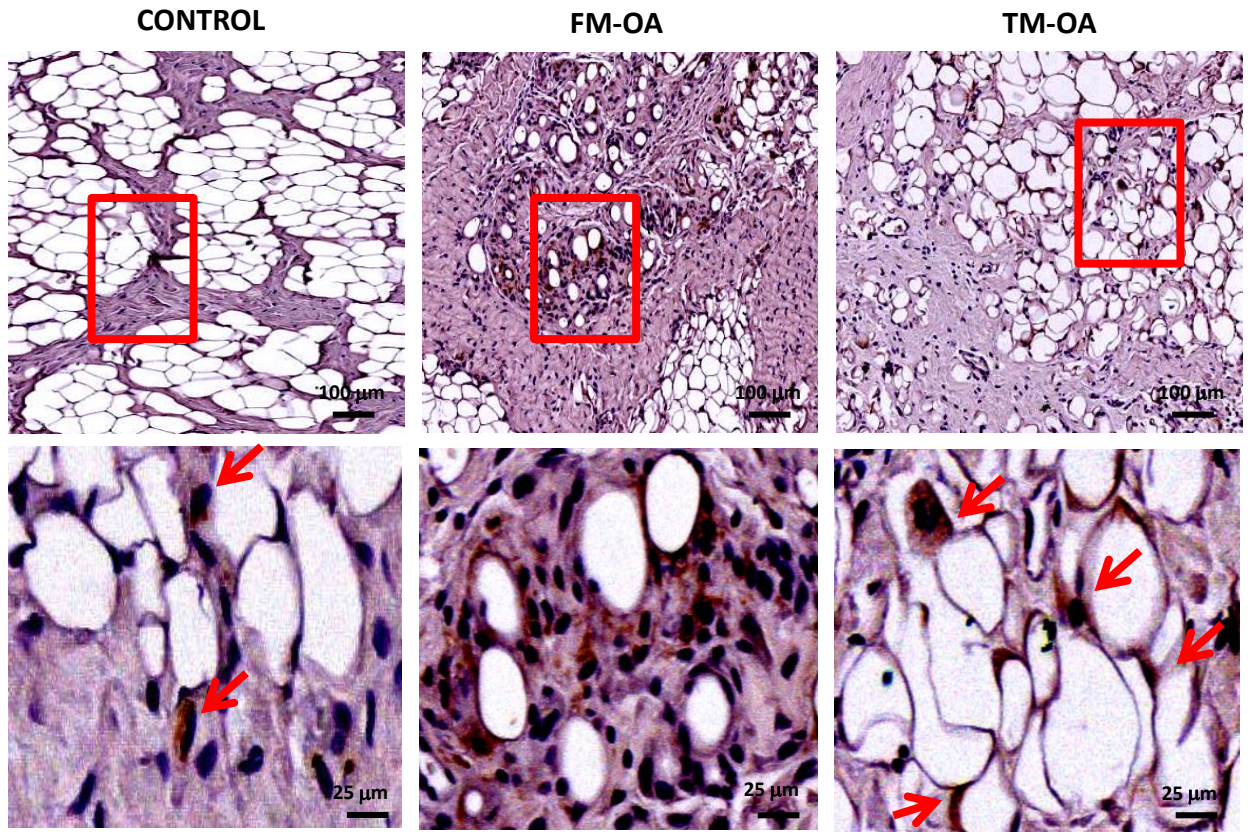
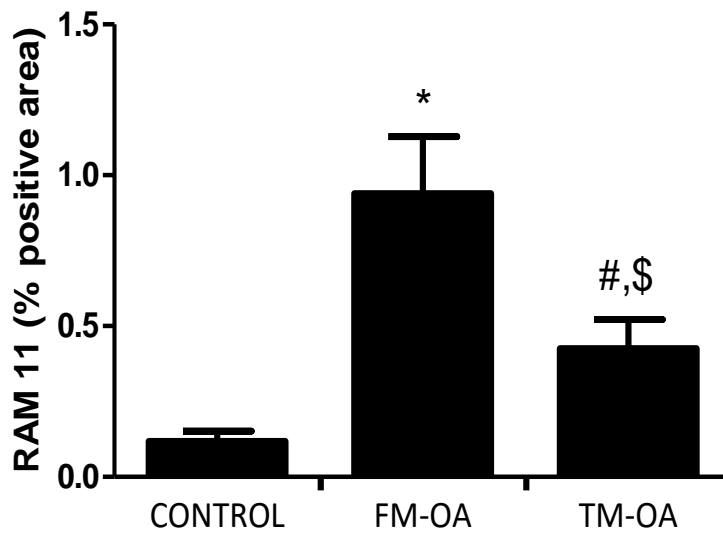
CONTROL

FM-OA

TM-OA

**Figure 3**

A**CONTROL****FM-OA****TM-OA****B****Lining Hypertrophy****Synovial Matrix****Inflammatory infiltrate****Figure 4**

A**B****Figure 5**

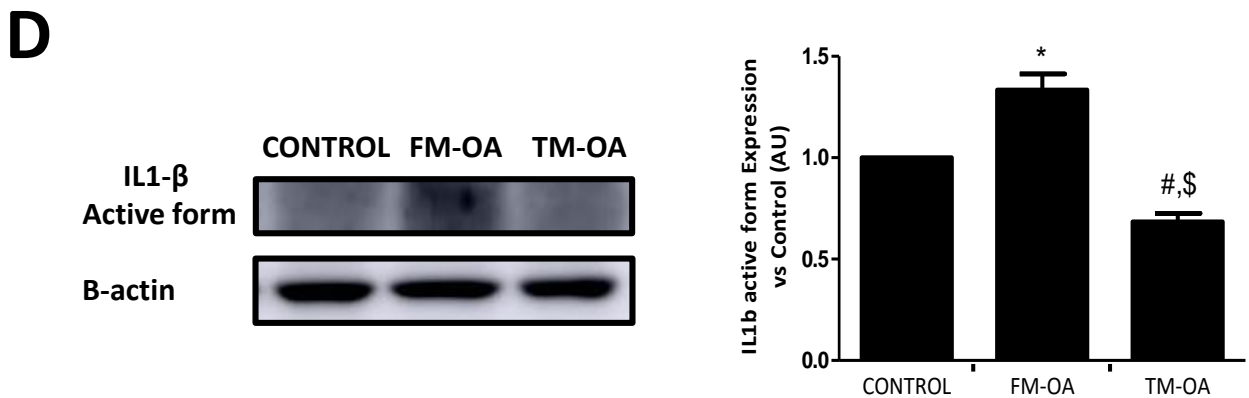
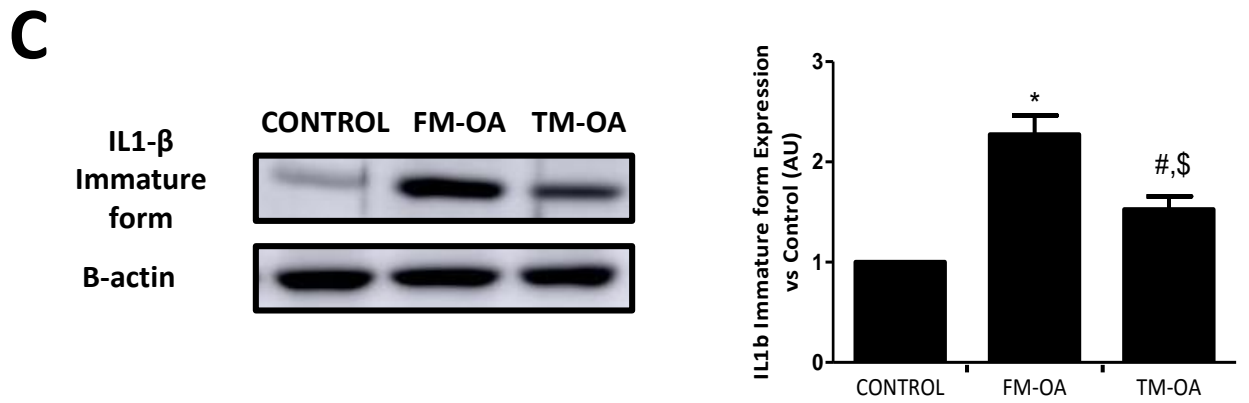
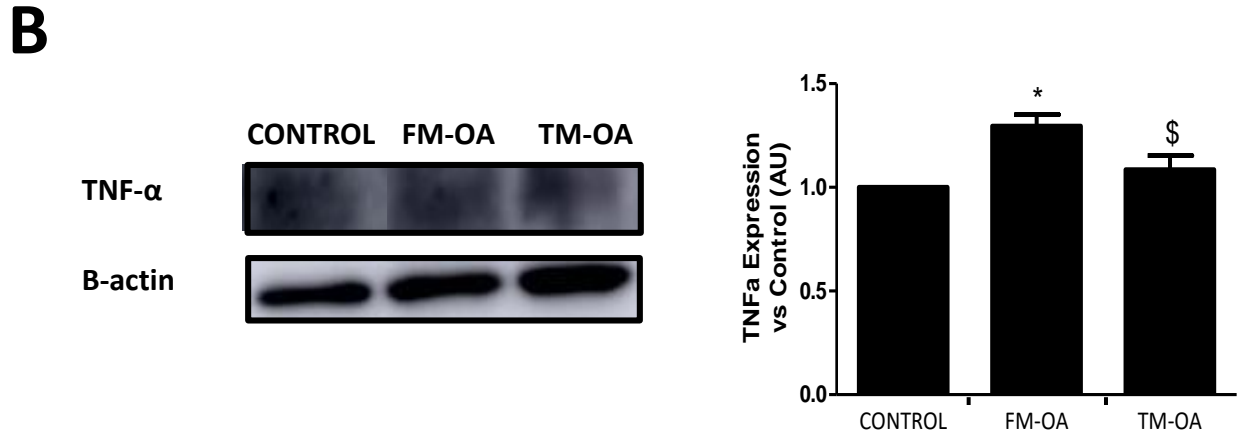
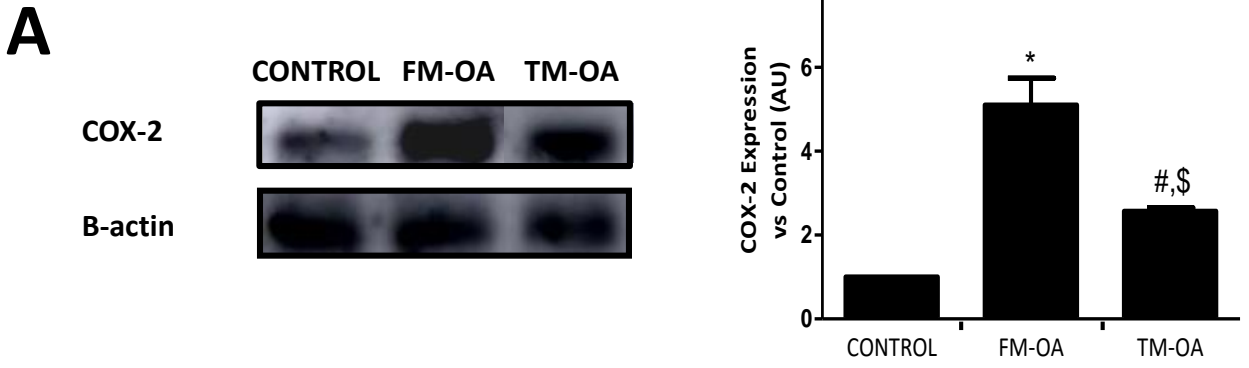


Figure 6

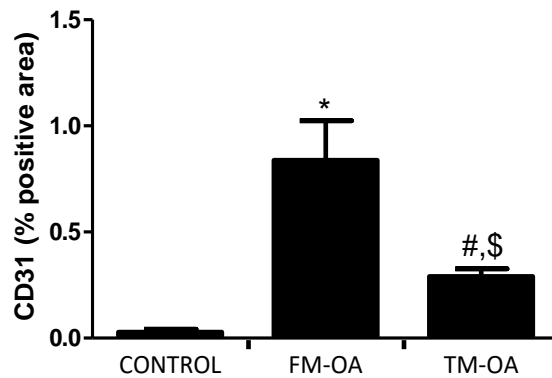
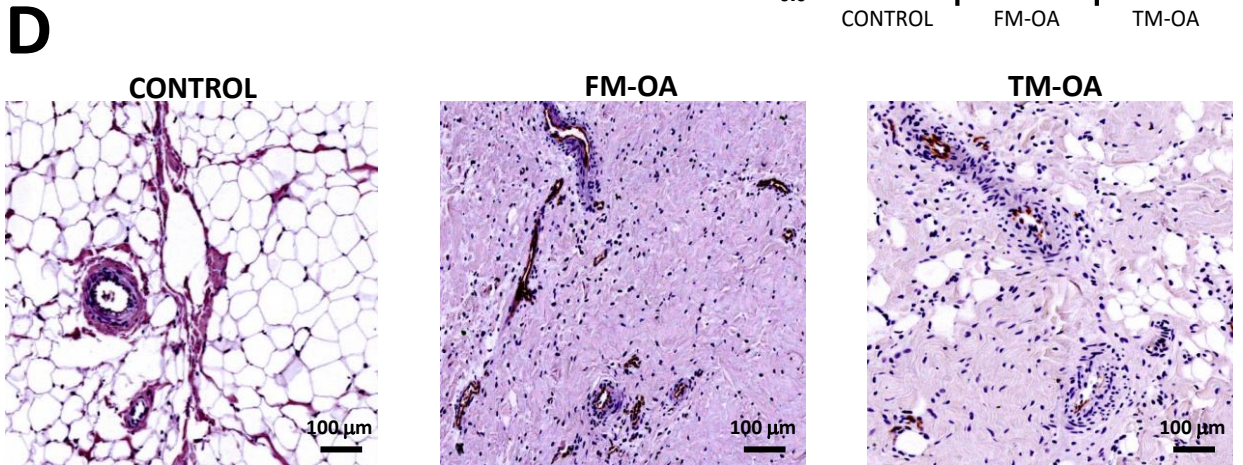
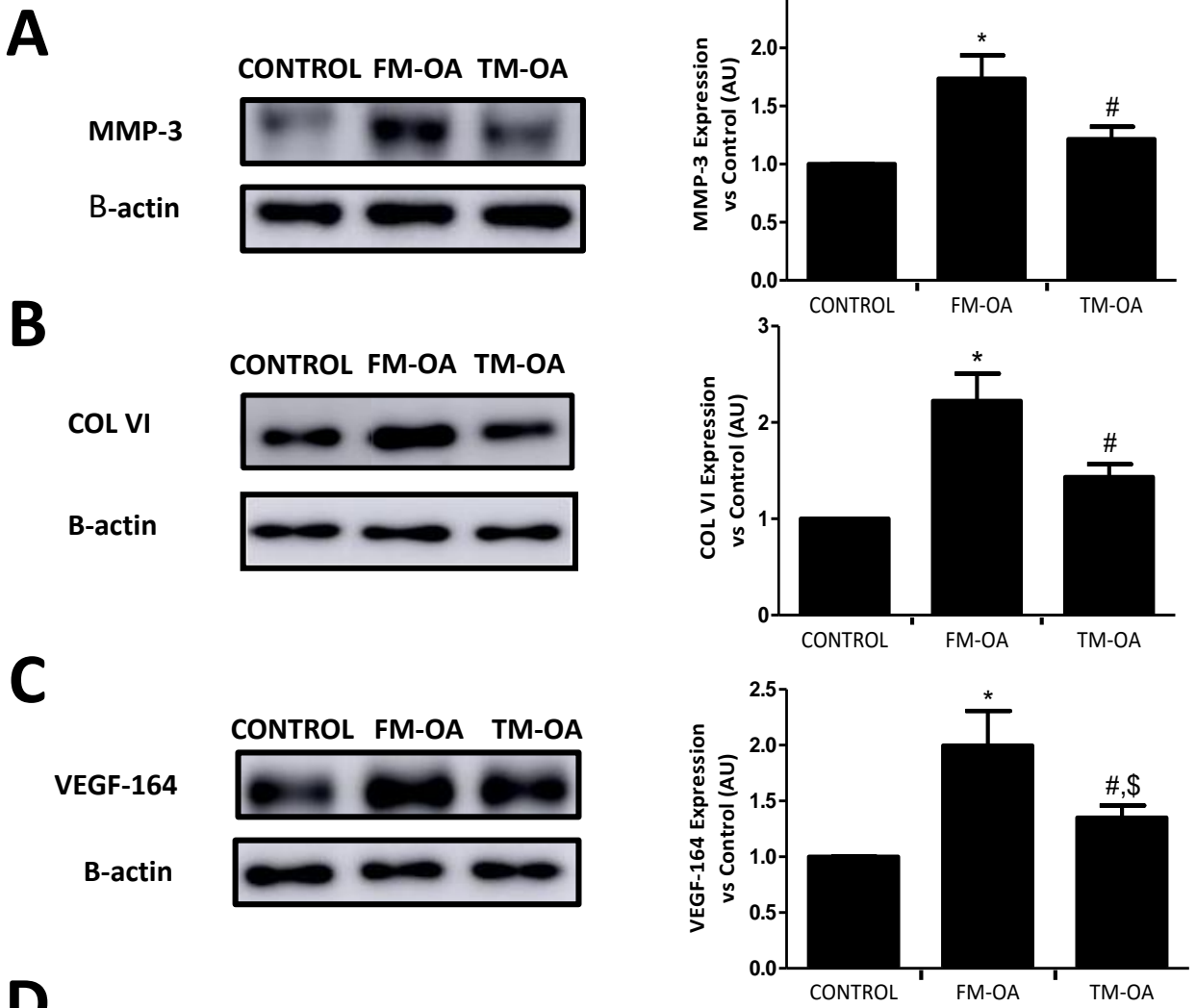


Figure 7

TABLE 1. Changes in subchondral cortical and trabecular bone measured by microCT.

SUBCHONDRAL CORTICAL BONE			
Parameters	CONTROL (n=6)	FM-OA (n=10)	TM-OA (n=10)
BMD (g/cm³)	5.17 ± 0.31	4.40 ± 0.48 [#]	5.05 ± 0.61 ^{#,*}
BMC (g)	0.0080 ± 0.0010	0.0042 ± 0.0018 [#]	0.0062 ± 0.0012 ^{#,*}
SUBCHONDRAL TRABECULAR BONE			
Parameters	CONTROL (n=6)	FM-OA (n=10)	TM-OA (n=10)
BMD (g/cm³)	2.65 ± 0.15	2.11 ± 0.19 [#]	2.51 ± 0.20 ^{#,*}
BMC (g)	0.046 ± 0.003	0.034 ± 0.003 [#]	0.041 ± 0.003 ^{#,*}
BV/TV (%)	0.3133 ± 0.0327	0.1631 ± 0.0222 [#]	0.2502 ± 0.0537 ^{#,*}
Tb. Th (mm)	0.1777 ± 0.0159	0.1522 ± 0.0164 [#]	0.1395 ± 0.0106 ^{#,*}
Tb. N (mm⁻¹)	1.7865 ± 0.0806	1.206 ± 0.070 [#]	2.020 ± 0.405 [*]
Tb. Sp (mm)	0.3198 ± 0.0460	0.6868 ± 0.0418 [#]	0.3804 ± 0.0398 ^{#,*}

Analysis by microCT of the subchondral cortical and trabecular bone in the metaphysis of proximal tibiae of healthy and OA rabbits with false manipulation (FM-OA) or true manipulation (TM-OA). Values are mean ± SD. [#] p<0.05 vs healthy control, ^{*} p<0.05 vs FM-OA. P values were obtained using the Mann-Whitney U-test.