

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA  
PGE<sub>2</sub> SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA SÍNTESIS  
DE MEDIADORES DEL METABOLISMO ÓSEO EN  
EL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES  
CON ARTROSIS**

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN MORENO RUBIO**

**MADRID, 2010**



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

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA  
PGE<sub>2</sub> SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA SÍNTESIS  
DE MEDIADORES DEL METABOLISMO ÓSEO EN  
EL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES  
CON ARTROSIS**

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN MORENO RUBIO**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA**

**DIRECTORES: RAQUEL LARGO CARAZO Y GABRIEL HERRERO-BEAUMONT**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR**

**FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**



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

#### CERTIFICAN

Que Don Juan Moreno Rubio, Licenciado en Biología Molecular y Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el laboratorio de Patología Osteoarticular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 10 de febrero de 2010.

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Dra. Raquel Largo Carazo

Doctorando: Juan Moreno Rubio

## Resumen

---

La Artrosis (OA) es la patología articular más frecuente. La característica principal de la OA es la degeneración del cartílago articular, aunque simultáneamente se producen cambios en el metabolismo de la membrana sinovial y del hueso subcondral lo que provoca la aparición de dolor y rigidez y la disminución de la funcionalidad. La PGE<sub>2</sub> es un mediador clave en la patogenia de la OA. El tratamiento más extendido para controlar los síntomas de la OA son los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). La eficacia terapéutica de los AINES se atribuye a su capacidad de disminuir la liberación de la PGE<sub>2</sub> mediante la inhibición de la actividad enzimática de la COX. Aunque actualmente estos fármacos se emplean durante largos periodos de tiempo, no se conocen con exactitud los efectos directos que tienen sobre el cartílago.

En esta tesis hemos demostrado que, una terapia prolongada con agentes bloqueantes de la PGE<sub>2</sub> disminuye la producción de PGE<sub>2</sub> no solo mediante la inhibición directa de las COX, sino también por la disminución en la expresión y en la síntesis de la COX-2 y la mPGES-1 en el cartílago articular de pacientes artrósicos. La disminución en la expresión y la síntesis de la iNOS podría contribuir en la reducción de la progresión de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el CBX y el ACF parecen tener un perfil antiinflamatorio diferente en cuanto al control de la presencia de citoquinas en el cartílago de pacientes con OA.

También hemos demostrado, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, que HIF-1 $\alpha$  y VEGF podrían regularse por un mecanismo independiente de la PGE<sub>2</sub> durante la OA.

Por último, hemos demostrado que en el cartílago de pacientes con artrosis, el tratamiento a largo plazo con CBX inhibe la señal resorptiva sintetizada por los condrocitos. *In vitro*, demostramos que la PGE<sub>2</sub> regula la expresión y la liberación de los principales mediadores del metabolismo óseo en condrocitos artrósicos.

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

## Summary

---

Osteoarthritis (OA) is the most common chronic joint disease. Joint cartilage degeneration is the central feature in OA, but is associated with concomitant changes in synovium and subchondral bone metabolism causing pain and stiffness in the involved joints and an impaired physical function. PGE<sub>2</sub> is a key mediator in the pathogenesis of OA. The most widespread agents employed for the control of OA symptoms are *Non*-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). The therapeutic efficacy of NSAID has been attributed to its ability to impair PGE<sub>2</sub> release by inhibiting COX enzyme activity. Although currently these drugs are employed over extended periods, their direct effects on cartilage are still to be fully defined.

This thesis demonstrates that prolonged therapy with PGE<sub>2</sub> blocking agents decreases PGE<sub>2</sub> production not only by direct inhibition of COX activity, but also by down-regulating COX-2 and mPGES-1 expression and synthesis in the articular cartilage of OA patients. The down-regulation of iNOS in the articular cartilage would also contribute to reduce the progression of the inflammatory response. However, CBX and ACF seem to have a different anti-inflammatory effect on cytokine synthesis both in the cartilage of OA patients.

We also demonstrated, by studies *in vivo* and *in vitro*, HIF-1 $\alpha$  and VEGF could be regulated by an independent mechanism of PGE<sub>2</sub> during the OA.

Finally, we have shown that in cartilage from patients with OA, long-term NSAID treatment inhibited the resorptive signal synthesized by chondrocytes. *In vitro*, we showed that PGE<sub>2</sub> regulated the expression and release of these key mediators of bone metabolism by articular chondrocytes.

This work opens new hypothesis for the mechanisms, both PGE<sub>2</sub> dependent and independent, which may control the progression of OA.

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. LA ARTROSIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cartílago: Estructura y cambios en la artrosis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Cambios durante la artrosis de otras estructuras articulares .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Hueso subcondral .....	3
1.2.2 Membrana sinovial .....	4
1.2.3 Otras estructuras articulares .....	4
<b>1.3 La inflamación en la artrosis .....</b>	<b>5</b>
<b>2. MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ARTROSIS .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Los Prostanoides .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 La Ciclooxygenasa .....	7
2.1.2 La Prostaglandina E sintasa .....	7
2.1.3 La Prostaglandina E <sub>2</sub> .....	8
<b>2.2 El Óxido nítrico .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Las óxido nítrico sintasas .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Las Citoquinas .....</b>	<b>10</b>
2.4.1 IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$ : Dos citoquinas proinflamatorias .....	11
<b>2.5 El factor de crecimiento del endotelio vascular .....</b>	<b>12</b>
<b>2.6 Sistema OPG/RANK/RANKL .....</b>	<b>13</b>
<b>3. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ARTROSIS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Los antiinflamatorios no esteroideos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 El Sulfato de Glucosamina .....	17

---

<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
1. ESTUDIOS EN PACIENTES.....	20
2. ESTUDIOS EN ANIMALES.....	21
3. CULTIVOS CELULARES.....	22
3.1 Fármacos empleados en los estudios <i>in vitro</i> .....	22
3.2 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.....	22
4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	23
5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	23
6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICA.....	23
7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DEL CARTÍLAGO DE LOS CONEJOS.....	24
8. WESTERN BLOT.....	24
9. INMUNOCITOQUÍMICA.....	24
10. MEDIDA DE PGE <sub>2</sub> .....	25
11. MEDIDA DE NITRITOS.....	25
12. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	25
13. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL.....	25
14. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES.....	26
15. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE LOS CONEJOS.....	27
16. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSCICO .....</b>	<b>28</b>
1.1 Información de los pacientes y respuesta clínica.....	28
1.2 Histopatología del cartílago articular de los pacientes.....	29
1.3 Efecto de los AINES sobre la liberación de PGE <sub>2</sub> en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo .....	30
1.4 Expresión y síntesis de COX-2 en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo	31
1.5 Expresión y síntesis de la mPGES-1 en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo .....	32
1.6 Expresión de los receptores EPs en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo .....	33
1.7 Expresión y síntesis de la iNOS en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo. Efecto de los AINES sobre la liberación de NO en condrocitos artrósicos en cultivo .....	35
1.8 Expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$ en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo .....	36
1.9 Expresión y síntesis de TNF- $\alpha$ en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.	37
<b>2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES ANGIOGÉNICOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSCICO .....</b>	<b>39</b>
2.1 Expresión de HIF-1 $\alpha$ y VEGF en pacientes con artrosis.....	39
2.2 Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la expresión de HIF-1 $\alpha$ y VEGF en condrocitos artrósicos en cultivo .....	40
2.3 Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$ en condrocitos artrósicos en cultivo .....	40
2.4 Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de VEGF en condrocitos artrósicos en cultivo .....	41
2.5 Efecto del tratamiento con SG sobre la síntesis de VEGF en un modelo experimental de artrosis en conejo.....	43



<b>3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE OPG/RANK/RANKL EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO .....</b>	<b>44</b>
3.1 Expresión génica de OPG, RANK y RANKL en pacientes con artrosis .....	44
3.2 Síntesis de OPG y RANKL en pacientes con artrosis .....	44
3.3 Ratio OPG / RANKL .....	45
3.4 Localización de OPG y de RANKL en el cartílago de los pacientes con artrosis.....	46
3.5 Efecto de la PGE <sub>2</sub> sobre la expresión y la síntesis de OPG, RANK y RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.....	47
3.6 Inmunocitoquímica de RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo .....	51
3.7 Efecto de diferentes agonistas y/o antagonistas de los distintos receptores EPs sobre la expresión y la síntesis de OPG y de RANKL.....	51
3.8 Estudios en animales.....	53
3.8.1 Histopatología del cartílago articular de los conejos .....	53
3.8.2 Síntesis de OPG y RANKL en el cartílago articular de los conejos .....	54
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE <sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO .....	55
2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE <sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES ANGIOGÉNICOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.....	59
3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE <sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE OPG/RANK/RANKL EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO .....	65
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## ABREVIATURAS.

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

AA	Ácido araquidónico
ACF	Aceclofenaco
AcG	N-Acetil Glucosamina
ACR	American College of Rheumatology
ADN <sub>c</sub>	ADN cíclico
AEM	Agencia europea del medicamento
AH	Ácido hialurónico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AP-1	Proteína activadora-1
BMP	Proteína morfogenética ósea
CBX	Celecoxib
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CS	Condroitín sulfato
DC	Diacereína
DCF	Diclofenaco
EPs	Receptores de membrana de PGE <sub>2</sub>
FDA	Agencia estadounidense para la administración de comida y fármacos
GAGs	Glicosaminglicanos
GMP <sub>c</sub>	Guanosín monofosfato cíclico
HG	Hidrocloruro de glucosamina
HIF-1	Factor inducible por hipoxia-1
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IL-1R	Receptor de IL-1
IL-1Ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IND	Indometacina

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Quinasa Jun N-terminal
LIF	Factor inhibidor de leucocitos
MAPK	Proteínas quinasas activada por mitógenos
MEC	Matriz extra celular
MMPs	Metaloproteasas
mPGES-1	Prostaglandina E sintasa microsomal-1
MXC	Meloxicam
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGHS	Prostaglandinas endoperóxido sintasas
PGs	Prostaglandinas
RANK	Receptor de RANKL
RANKL	Ligando activador del receptor del factor nuclear Kappa B
SG	Sulfato de glucosamina
sPLA2	Fosfolipasa A2 soluble
SYSADOAS	Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis
TACE	Enzima convertora de TNF-α
TGF β	El Factor de Crecimiento Transformante β
TNF-R	Receptor del TNF-α
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TXs	Tromboxanos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del VEGF

## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. LA ARTROSIS.

Según la Organización Mundial de la Salud, la artrosis es la causa más importante de discapacidad funcional del aparato locomotor en todas las razas y zonas geográficas, y afecta al 80% de la población mayor de 65 años en los países industrializados. El *“American College of Rheumatology”* (ACR) define artrosis como: “un grupo heterogéneo de condiciones que conducen a síntomas y a signos articulares, los cuales se asocian con defectos en la integridad del cartílago articular, además de cambios relacionados con el hueso subcondral y con los márgenes articulares” [1]. La principal característica de la artrosis es, por lo tanto, la degeneración progresiva del cartílago articular. A esta degeneración le acompañan cambios en todas las estructuras articulares: la cápsula articular, los tejidos blandos periarticulares, la membrana sinovial y el hueso subcondral, lo que origina dolor, rigidez e incapacidad funcional [2]. No se conoce, de forma definitiva, la causa de la artrosis. Las investigaciones realizadas hasta la fecha sugieren que los cambios estructurales son debidos a la combinación de diversos factores sistémicos, como el sexo, la edad, la herencia, la densidad mineral ósea, etc. y factores locales como la obesidad, ejercicio físico, traumatismos repetidos, sobrecarga articular, etc.

### 1.1 Cartílago: Estructura y cambios en la artrosis.

El cartílago articular es un tejido altamente especializado, componente fundamental del sistema esquelético en áreas donde se requiere de una arquitectura semisólida para dar forma, fuerza, flexibilidad y resistencia. Clásicamente se ha considerado al cartílago como un tejido avascular, aneural y alinfático, compuesto por único tipo celular, los condrocitos, rodeados por una matriz extracelular (MEC) que ellos mismos secretan.

Los condrocitos suponen aproximadamente el 10% del peso del cartílago. Producen la MEC adyacente, pero también son capaces de despoliarla y eliminarla. Los condrocitos varían morfológicamente dependiendo de la zona en la que se encuentran y su función viene determinada por los cambios sufridos en la propia MEC.

La MEC es responsable de las características mecánicas del cartílago. Se compone de agua, colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas extracelulares. El agua se distribuye en función de su localización. El colágeno es mayoritariamente de tipo II, lo que confiere al cartílago una gran resistencia a la tensión, aunque también se observan pequeñas cantidades de colágeno tipo I, IV, IX, X y XI. El colágeno tipo VI se encuentra en fases precoces de la artrosis y el tipo X se asocia a la calcificación del cartílago. Los proteoglicanos son macromoléculas complejas responsables de la resistencia a la compresión del cartílago. Se componen de subunidades denominadas glicosaminglicanos (GAGs). Estos GAGs se unen a un núcleo proteico formando los proteoglicanos mediante proteínas de enlace al ácido hialurónico (AH), un GAGs sin sulfatar que no forma proteoglicanos. Los proteoglicanos tienen una vida media de tres meses, presentan una gran capacidad para retener agua y son los responsables de la estructura porosa del cartílago. Por último, las glicoproteínas extracelulares tienen funciones de unión entre la MEC y los condrocitos.

En el cartílago articular humano se pueden diferenciar las siguientes capas (Figura 1):

Capa superficial (40  $\mu\text{m}$  de espesor). Con escasa actividad metabólica, presenta pocos proteoglicanos y una elevada concentración de fibras de colágeno distribuidas paralelas a la superficie. Soporta las fuerzas de cizallamiento. Los condrocitos presentes están muy aplanados y paralelos a la superficie.

Capa intermedia o de transición (500  $\mu\text{m}$  de espesor). Con una elevada actividad metabólica, posee mayor presencia de proteoglicanos y menos colágeno, dispuesto oblicuamente y al azar. Soporta fuerzas de compresión y los condrocitos presentes son más redondeados.

Capa profunda o radial (1000  $\mu\text{m}$  de espesor). Rica en proteoglicanos y fibras de colágeno. Éste se distribuye radialmente formando arcos. Las células son redondeadas y forman columnas y también soporta fuerzas de compresión.

Capa calcificada (300  $\mu\text{m}$  de espesor). No presenta proteoglicanos y el colágeno está dispuesto radialmente. Posee cristales de hidroxapatita y es adyacente al hueso subcondral. Es la capa de anclaje del cartílago al hueso. La celularidad es escasa. Está separada de la anterior por el frente de calcificación o *tidemark*, de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, que es una barrera ondulada con disposición tangencial de sus fibras que permite soportar las fuerzas de cizallamiento.

El cartílago articular está sujeto a un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de MEC) y catabólicos (degradación de la matriz). En la articulación adulta y sana estos procesos están en equilibrio y las moléculas destruidas son reemplazadas por moléculas nuevas. El condrocito, es responsable de la síntesis y del mantenimiento de la MEC, a través de la liberación de sustancias sintetizadas y degradadas durante los procesos anabólicos y catabólicos. Bajo circunstancias normales, los condrocitos responden sintetizando componentes de la matriz como colágeno tipo II y proteoglicanos. Sin embargo, durante la artrosis, los condrocitos alteran su metabolismo e inducen un aumento en la producción de proteasas y de mediadores proinflamatorios. Estos procesos conducen a una elevada concentración de citoquinas como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , que, a su vez, inducen una disminución en la síntesis de colágeno y proteoglicanos [3, 4] y un incremento en la concentración de proteasas degradativas, entre las que se incluyen las metaloproteasas, y de otros mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la prostaglandina E sintasa microsomal 1 (mPGES-1), la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el óxido nítrico (NO) [5-8].

Independientemente de cuál sea el factor desencadenante, en el cartílago durante la artrosis se producen una serie de eventos bioquímicos y moleculares que originan la aparición de cambios macroscópicos y microscópicos en todos los niveles del cartílago articular. En su estructura, se origina una fibrilación superficial gradual, que se puede extender hasta el hueso subcondral, produciendo una disminución progresiva del grosor del cartílago articular con pérdida completa en algunas zonas (Figura 1). En las primeras fases de la artrosis se produce un aumento en la densidad celular y en la capacidad sintetizadora de los condrocitos, en un intento de compensar la pérdida de MEC, pero finalmente el número de células existentes en el tejido disminuye (Figura 1). Este número celular va a depender del equilibrio entre división y muerte celular. En los últimos años ha cobrado especial relevancia el papel de la

senescencia y de la muerte celular del condrocito por apoptosis que conduce a un cartílago hipocelular [2, 9, 10]. En la MEC inicialmente se produce un aumento del contenido de agua, proteoglicanos y fibronectina, pero en estadios más avanzados de la enfermedad se ocasiona una disrupción de la organización del tejido y una pérdida de proteoglicanos, AH y colágeno.

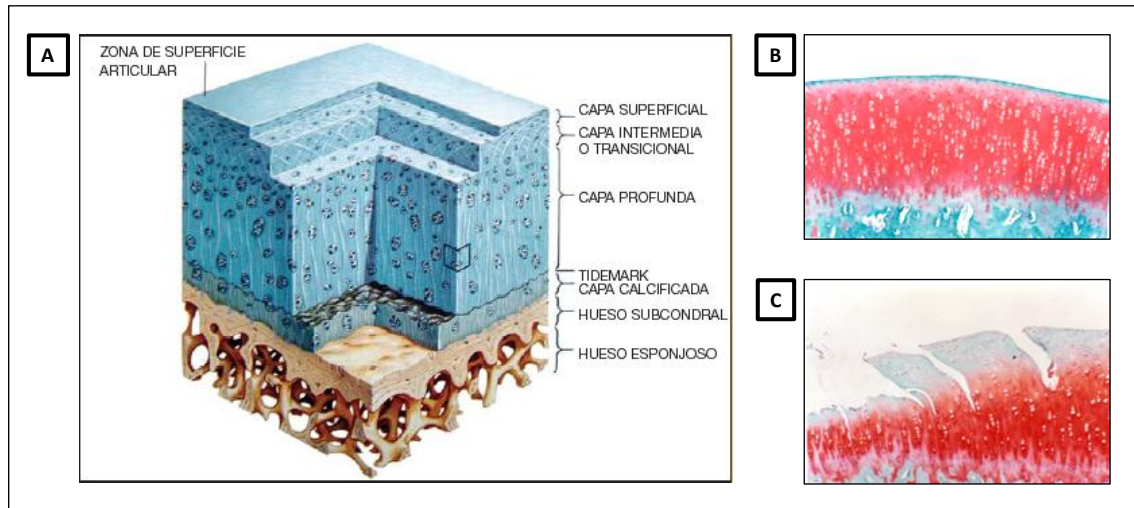


Figura 1. A: Esquema de las capas del cartílago articular sano. B y C: Imágenes microscópicas del cartílago articular normal (B) y artrósico (C), en las que se puede observar los cambios que acontecen en el tejido dañado.

## 1.2 Cambios durante la artrosis de otras estructuras articulares.

### 1.2.1 Hueso subcondral.

El hueso subcondral es el tejido subarticular mineralizado que se extiende desde el frente de calcificación hasta el inicio de la médula ósea. Sus funciones principales consisten en dar soporte al cartílago articular suprayacente, distribuir la carga mecánica, absorber la tensión continua de los impactos mecánicos y nutrir las capas profundas del cartílago hialino, especialmente en el periodo de crecimiento. El hueso subcondral incluye al menos tres estructuras bien diferenciadas: el cartílago calcificado, un hueso laminar corticalizado y el hueso subcondral trabecular. Las dos primeras son conocidas en la literatura como placa subcondral. Algunos autores incluyen también un hueso trabecular subarticular por debajo del hueso subcondral trabecular, cuyos límites no están bien definidos. El espesor del hueso subcondral varía en función de la especie animal, edad, masa corporal, localización y tipo de articulación. Así, el grosor del hueso subcondral del platillo tibial humano puede llegar hasta 2-3 mm en la zona de más carga. El hueso subcondral está muy vascularizado, aunque la mayoría de los vasos no alcanzan el cartílago calcificado y, excepto en estados patológicos como la artrosis, ninguno penetra en el cartílago hialino [11]. El cartílago calcificado puede aumentar de espesor mediante osificación endocondral, contribuyendo a lo que se denomina esclerosis subcondral. Asimismo, el hueso subcondral puede incrementar su grosor por aposición directa de hueso (modelado óseo) y/o variar su densidad a través del remodelado óseo. En condiciones fisiológicas, el crecimiento, modelado y remodelado óseos ocurren constantemente a lo largo de la vida, pero su actividad es diferente en los tres tejidos mineralizados mencionados, con diferente resultado sobre la masa, geometría y mecánica articular. El proceso de osificación

endocondral ocurre normalmente a lo largo de toda la vida, dando lugar en la artrosis a un avance, aplanamiento y duplicidad del frente de calcificación y a un aumento de espesor del cartílago calcificado, que puede alcanzar hasta un 25% del espesor total del cartílago (en condiciones normales la relación entre ambos suele ser 10 a 1). Estos cambios confieren mayor rigidez al cartílago calcificado y mayor sobrecarga del cartílago suprayacente, lo que favorece el desarrollo de la artrosis. Sin embargo, y aunque la densidad aparente del hueso subcondral es significativamente mayor en los pacientes artrósicos que en los individuos normales, la densidad mineral ósea real puede ser significativamente menor debido a una hipomineralización de dicho tejido [11]. En radiografías de pacientes con artrosis en fases avanzadas, es evidente la esclerosis en el hueso subcondral, confirmada mediante estudios microscópicos que describen un aumento en el volumen del hueso [12, 13]. Sin embargo, varios investigadores sugieren que en fases tempranas de la artrosis se produce un incremento en la resorción ósea [14-17]. La liberación de citoquinas y metaloproteasas que ocurre durante la destrucción del cartílago y el estrés del hueso podrían iniciar estas respuestas tempranas en el hueso subcondral [16, 18], ya que en la interfase entre el hueso y el cartílago, se han encontrado niveles elevados de MMP-9 y -13, BMPs y IL-6 [15, 18]. La producción local de IGF-1 y TGF $\beta$  contribuyen en el remodelado del hueso subcondral durante la artrosis [19]. Además, existen evidencias de que la producción de VEGF y de otros marcadores endoteliales promueven la penetración de nuevos vasos sanguíneos atravesando el frente de calcificación desde el hueso subcondral hacia el cartílago. La angiogénesis osteocondral es independiente del proceso que ocurre en la sinovial [20]. Todavía no está claro si las citoquinas del hueso fuerzan la progresión de la artrosis o si son una respuesta a los eventos mecánicos y moleculares que se producen en el cartílago y la sinovial durante la artrosis. Sin embargo, lo que cada vez está más claro es que la relación entre hueso y cartílago es muy estrecha y que ambos tejidos pueden mantener una permanente comunicación tanto desde un punto de vista biomecánico, como intercelular e intermolecular.

### 1.2.2 Membrana sinovial.

Los cambios que acontecen en la membrana sinovial artrósica afectan a varios niveles: se produce una hiperplasia moderada de la capa íntima, edema intersticial, incremento de la vascularización, activación de las células resistentes del estroma e infiltrado de la membrana sinovial por células inflamatorias, incluyendo células B y T activadas [21].

Estudios histopatológicos de la membrana sinovial de pacientes con artrosis demostraron la presencia de sinovitis en dichas membranas, localizada junto a las zonas en las que se produce la degeneración del cartílago articular [21]. Además, Shibakawa y colaboradores demostraron la presencia de un pannus en la articulación artrósica que mediante la liberación de colagenasas contribuye a la destrucción del cartílago articular [22].

### 1.2.3 Otras estructuras articulares.

También se producen cambios durante la artrosis en otras estructuras articulares como en el margen articular donde aparece un crecimiento anómalo de cartílago, que se osifica originado osteofitos, en la cápsula que se engruesa a



medida que la artrosis avanza y en el tejido periarticular donde pueden aparecer tendinitis o bursitis acompañando a la artrosis, tal vez por la sobrecarga mecánica de la articulación.

### 1.3 La inflamación en la artrosis.

La artrosis se asocia frecuentemente con signos y síntomas de inflamación, incluyendo el dolor, hinchazón y rigidez que conducen a un deterioro funcional significativo [23]. Aunque el debate sobre el papel de la inflamación sinovial en la artrosis todavía está de actualidad, la sinovitis participa en la evolución de la artrosis tanto en las fases tempranas como en etapas avanzadas, gracias al infiltrado de la membrana sinovial por células inflamatorias, entre las que se incluyen células B y T activadas, y por la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios [24]. La inflamación sinovial es un factor que probablemente contribuye alterando la regulación funcional de los condrocitos y favoreciendo el desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos del cartílago [25]. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* evidencian que los condrocitos pueden producir y/o responder a una serie de citoquinas y mediadores proinflamatorios presentes en los tejidos y en los fluidos artrósicos. La relación entre el incremento en el líquido sinovial y en los tejidos articulares de los niveles de enzimas catabólicas y mediadores proinflamatorios como la PGE<sub>2</sub>, el NO, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  entre otros, está bien documentada, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se inicia la producción de estos mediadores inflamatorios. Los tejidos artrósicos, entre ellos el cartílago, sintetizan IL-1 $\beta$  en concentraciones suficientes como para estimular su propia síntesis a la vez que inducen, tanto en condrocitos como en sinoviocitos, la síntesis de otras citoquinas como el TNF- $\alpha$  y de mediadores catabólicos como la metaloproteasa-1 (MMP-1), MMP-3, 8 y 13 y agreganasas, degradando así la MEC del cartílago [26, 27]. Además de inducir la síntesis de MMPs y de otras proteinasas, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  incrementan la síntesis de PGE<sub>2</sub> mediante la estimulación de la expresión de la COX-2, la mPGES-1 y la fosfolipasa A2 soluble (sPLA2), y aumentan la producción de NO mediante la iNOS. La IL-1 $\beta$  también induce otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-8, la IL-17, la IL-18, el factor inhibidor de leucocitos (LIF), y reduce la expresión de genes asociados con el fenotipo de los condrocitos diferenciados [28, 29]. Las citoquinas que expresan los tejidos artrósicos participan en la degradación del cartílago [30]. El aumento en la expresión de los mediadores proinflamatorios como la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$ , la COX-2, la mPGES-1, la iNOS, etc. está mediado por la inducción y la activación de diversos factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), la proteína activadora 1 (AP-1), el factor inducible por la hipoxia (HIF-1), normalmente implicados en señales de estrés e inflamación.

Los condrocitos y las células sinoviales responden a diversas señales mediante la producción de citoquinas, de otros mediadores proinflamatorios y de proteinasas que degradan la MEC del cartílago. Los productos originados de esta degradación de la MEC pueden a su vez provocar la liberación de colagenasas y de otros mediadores que aumentarían la gravedad de estos eventos celulares. También podrían aumentar la concentración de factores anabólicos como BMPs y TGF $\beta$ , que participarían en la formación de osteofitos. Además, se pueden observar en muestras de pacientes con artrosis avanzada un aumento de la zona calcificada del cartílago, la duplicación del frente de calcificación y la invasión de vasos sanguíneos desde el hueso subcondral hacia el cartílago (angiogénesis).

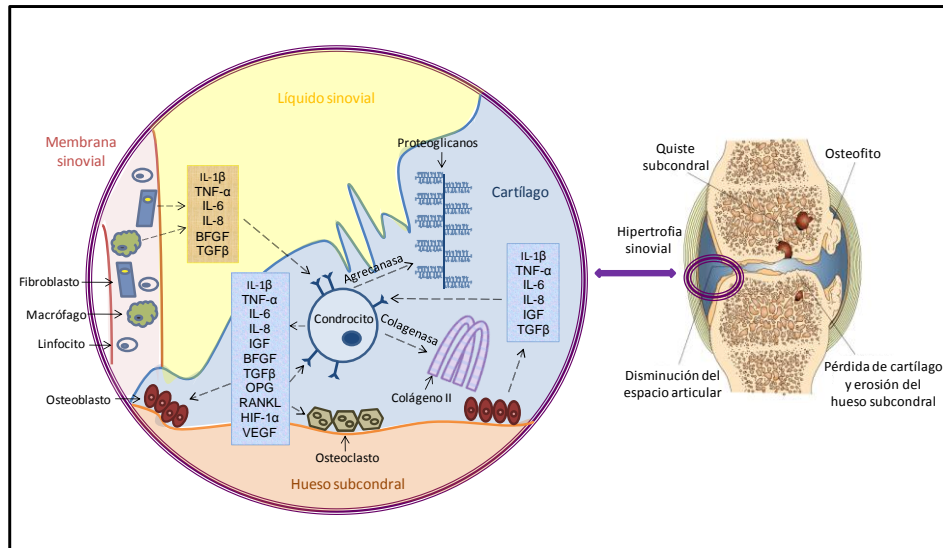


Figura 2. Cambios que se producen en la articulación artroscópica.

## 2. MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ARTROSIS.

El proceso inflamatorio, la degradación del cartílago y los cambios en el hueso subcondral en la artrosis están regulados por una serie de moléculas de distinta naturaleza y función. Entre estos mediadores, cabe destacar las citoquinas, las quimioquinas, los prostanooides, las metaloproteasas y las especies reactivas de oxígeno. A continuación, describiremos algunas de estas moléculas.

### 2.1 Los Prostanoides.

La familia de los prostanooides incluye a las prostaglandinas (PGs) y a los tromboxanos (TXs), potentes mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico tras la acción de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y distintas PG y TX sintasas. Estos compuestos poseen importantes funciones en procesos fisiológicos tales como la homeostasis renal y vascular y el crecimiento y la diferenciación celular. Son esenciales además en el proceso inflamatorio asociado a múltiples patologías, como la artritis, la artrosis, la aterosclerosis y el cáncer.

Los precursores de estos compuestos son los ácidos grasos poliinsaturados, que se transforman por esterificación del glicerol en colesterol y fosfolípidos que se almacenan en la membrana plasmática. El ácido araquidónico (AA) es el precursor de prostanooides más importante. La biosíntesis de los prostanooides implica una secuencia de tres pasos. Primero se produce la liberación de los ácidos grasos de la membrana celular por la fosfolipasa A<sub>2</sub> o por la fosfolipasa C, siendo el ácido araquidónico el más abundante de todos ellos. El segundo paso consiste en la conversión de estos ácidos grasos en endoperóxidos inestables gracias a la acción de las prostaglandinas endoperóxido sintasas (PGHS) o ciclooxigenasas (COX). En el tercer y último paso se isomeriza o se reduce este producto hasta formar las prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), las prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y los tromboxanos (TxA<sub>2</sub>)

mediante sintasas específicas [31]. Los diferentes prostanoides ejercen su acción a través de sus correspondientes receptores de membrana (DP, EP, FP, IP y TP).

### 2.1.1 La Ciclooxygenasa.

La ciclooxygenasa (COX o PGHS) es una hemoproteína que cataliza la conversión del AA a  $\text{PGH}_2$ . Es una proteína bifuncional con dos actividades independientes: ciclooxygenasa y peroxidasa. La primera reacción ciclooxygenasa convierte el AA en la prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ), y la segunda reacción peroxidasa reduce la  $\text{PGG}_2$  a  $\text{PGH}_2$ . Estas dos reacciones se producen en sitios diferentes de la enzima pero funcional y estructuralmente conectados: la reacción ciclooxygenasa se produce en un canal hidrofóbico en el núcleo de la enzima y la reacción peroxidasa se produce gracias a un grupo hemo localizado en el centro activo de la enzima, cerca de la superficie de la proteína [31].

Aunque la COX se purificó y se secuenció en la década de los 70 [32], la existencia de dos isoformas no se describió hasta los años 90 [33]. En la actualidad se conocen tres isoformas de la COX en mamíferos [34]. La COX-1, la forma constitutiva, se encarga de la producción fisiológica de PGs [35]. Está localizada en casi todos los tejidos del organismo y las PGs derivadas de esta enzima participan en respuestas fisiológicas como la homeostasis vascular, la reabsorción renal de  $\text{Na}^+$  y la protección de la mucosa gastrointestinal [36]. La COX-2 no se expresa en la mayoría de las células en condiciones normales, y su expresión es inducible como respuesta a citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento o endotoxinas [34]. La elevada producción de la COX-2 se considera el mecanismo por el que aumentan los niveles de las PGs durante la inflamación [36]. COX-1 y COX-2 son homodímeros. Comparten aproximadamente el 60% de homología tanto a nivel de ADN cíclico (ADNc) como a nivel de aminoácidos y tienen propiedades estructurales y cinéticas similares [31]. La COX-3 es la isoforma más recientemente descubierta. Aunque se han descrito diferentes propiedades farmacológicas para la COX-3, muchos investigadores consideran que es una variante de *splicing* de la COX-1 [37, 38]. La distribución de las isoformas difiere entre las especies y entre los tejidos. En la articulación, la COX-1 se expresa tanto en sinoviocitos como en condrocitos sanos. En cambio, la COX-2 es detectable en situaciones patológicas en el cartílago y en la membrana sinovial tanto en pacientes con artritis como con artrosis [39]. En cuanto a la localización celular se ha visto que ambas enzimas se localizan tanto en el retículo endoplásmico como en la membrana nuclear, encontrándose las dos isoformas en concentraciones similares en los compartimentos celulares [40].

### 2.1.2 La Prostaglandina E sintasa.

La prostaglandina E sintasa (PGES) es la enzima terminal en la cascada de síntesis de la  $\text{PGE}_2$  y cataliza la isomerización de la  $\text{PGH}_2$  a la  $\text{PGE}_2$ . Presenta tres isoformas, la PGES microsomal 1 (mPGES-1), la PGES microsomal 2 (mPGES-2) y la PGES citosólica (cPGES) [41].

La mPGES-1, es una isoforma inducible de 16 KDa, se localiza en la membrana nuclear y requiere glutatión (GSH) como cofactor esencial para su actividad enzimática [42]. Esta acoplada funcionalmente a la COX-2 y los estímulos proinflamatorios como la  $\text{IL-1}\beta$  y el  $\text{TNF-}\alpha$  inducen su expresión génica [43], contribuyendo a la producción de la

PGE<sub>2</sub> durante la respuesta inflamatoria. Se ha descrito la implicación de esta enzima en las enfermedades reumatoides ya que su expresión está aumentada tanto en la artritis como en la artrosis. Además, estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la mPGES-1 y la COX-2 colocalizan en la región perinuclear tanto de condrocitos [44] como de sinoviocitos estimulados con IL-1 $\beta$  [45].

La mPGES-2 es una proteína de 33 KDa que se expresa constitutivamente en diferentes tipos celulares y cuyos niveles no aumentan en situaciones inflamatorias [46]. Esta enzima no necesita glutatión y parece estar asociada tanto a la COX-1 como a la COX-2 en la producción de PGE<sub>2</sub> en procesos de inflamación crónica y aguda respectivamente [46].

La cPGES es una proteína citosólica de 26 KDa que se expresa constitutivamente en una gran variedad de tejidos y células y cuya expresión no está inducida por estímulos proinflamatorios en la mayor parte de las células. Esta isoforma se localiza en el citosol y está acoplada principalmente a la COX-1. Se ha observado que la cPGES está implicada en la protección de la mucosa gastrointestinal y en algunas funciones neuronales [47].

La múltiple identificación de enzimas de la PGES revela la existencia de al menos dos rutas biosintéticas segregadas, la constitutiva COX-1/cPGES, crucial en la producción de PGE<sub>2</sub> requerida para el mantenimiento de los tejidos en homeostasis, y la inducible COX-2/mPGES-1 [43], en respuesta a estímulos inflamatorios.

### 2.1.3 La Prostaglandina E<sub>2</sub>.

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es el principal prostanoide producido por muchos tejidos y tipos celulares. Muchos trabajos han confirmado la relevancia de la PGE<sub>2</sub> como mediador de la respuesta inflamatoria y de la respuesta inmune, y su implicación en la remodelación, formación y resorción ósea, entre otras funciones.

En cuanto a las enfermedades reumáticas, se ha demostrado que los tejidos articulares liberan gran cantidad de prostaglandinas, especialmente de PGE<sub>2</sub> [48, 49]. En pacientes con artrosis, se han detectado altas concentraciones de PGE<sub>2</sub> en la membrana y en el líquido sinovial [50, 51]. De hecho, la membrana sinovial es la fuente principal de PGE<sub>2</sub> durante la artrosis [51], aunque los condrocitos, los sinoviocitos y los macrófagos pueden sintetizarla [52]. La PGE<sub>2</sub> modula varios de los principales procesos implicados en la destrucción gradual del tejido en la artrosis, como son la activación de proteasas, la síntesis de proteínas de la matriz, la neoangiogénesis, la síntesis de mediadores estructurales, etc. [28, 52-56]. Otros estudios han demostrado que la PGE<sub>2</sub> presenta también efectos antiproliferativos y proapoptóticos [49, 52].

El papel de la PGE<sub>2</sub> en el desarrollo de la artrosis es un tema que aún en la actualidad crea controversia, ya que la PGE<sub>2</sub> podría tener una doble función. En el cartílago, la PGE<sub>2</sub> puede ejercer efectos pro ó anticatabólicos [28]. La PGE<sub>2</sub> inhibe la degradación tanto de los proteoglicanos como de las proteínas de la matriz [57, 58], estimula la expresión génica del colágeno tipo II [59, 60] y estimula la síntesis de proteoglicanos y colágeno a través de la inducción del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) [60, 61]. Por otro lado, la PGE<sub>2</sub> promueve la degradación de la matriz del cartílago [62], presenta efectos antiproliferativos y proapoptóticos [52, 63] y la inhibición de la PGE<sub>2</sub>

previene el daño del cartílago inducido por citoquinas [64] e incrementa la síntesis de proteoglicanos en el cartílago artrósico [65, 66].

La PGE<sub>2</sub> ha sido durante décadas diana terapéutica en el tratamiento de la artrosis, ya que su inhibición mejora algunos síntomas de esta patología como el dolor y la función articular. Aunque los inhibidores de la PGE<sub>2</sub> se usan en la actualidad como tratamiento durante periodos prolongados de tiempo, todavía no se conoce el efecto directo que tiene la inhibición de esta prostaglandina en el cartílago a largo plazo, ni desde el punto de vista inflamatorio ni desde el punto de vista estructural, ya que existen muy pocos estudios que evalúen estos resultados.

La variedad en los efectos que provoca la PGE<sub>2</sub> podría explicarse en parte por la existencia de cuatro receptores diferentes para este mediador, denominados EP1, EP2, EP3 y EP4 [67]. Los receptores EPs son receptores acoplados a proteínas G, y se han clasificado farmacológicamente en base a su respuesta y afinidad con diferentes agonistas y antagonistas y a su expresión que parece que depender del tipo celular. Cada receptor está codificado por un gen distinto y difieren en la cadena de aminoácidos, en las propiedades farmacológicas y en las propiedades de la transducción de la señal. Si bien existen varios ligandos para los receptores EPs, la PGE<sub>2</sub> es el ligando más potente y se une a cada uno de los cuatro receptores, pero con diferentes afinidades. La unión de la PGE<sub>2</sub> con EP1 conduce principalmente a un aumento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular, mientras que la unión con los receptores EP2 y EP4 induce un incremento en la concentración de AMP<sub>c</sub> mediante la estimulación de la adenilato ciclasa. El receptor EP3 presenta varias isoformas por *splicing* alternativo y la principal vía de señalización de este receptor es la inhibición de la adenilato ciclasa mediante el acoplamiento de una proteína G<sub>i</sub>, aunque las funciones que llevan a cabo las diferentes isoformas pueden ser distintas [68]. Las funciones de los receptores EP2 y EP4 pueden parecer redundantes en algunos procesos, por ejemplo, tanto EP2 como EP4 median en la inducción por PGE<sub>2</sub> de RANKL a través de la vía del AMPc en la osteoclastogénesis, pero la contribución de cada receptor podría ser diferente [69, 70]. Además, existen procesos en los que EP2 y EP4 juegan roles diferentes, lo que puede estar relacionado con que EP4 (y no EP2), puede activar la vía de señalización de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) por un mecanismo independiente de la activación de la vía de la adenilato ciclasa [71].

## 2.2 El Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, sintetizado en las células de los mamíferos por la oxidación del aminoácido L-arginina a L-citrulina. Esta reacción está catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS). El NO es lábil y en presencia de oxígeno se metaboliza rápidamente a su forma inactiva, estable y definitiva, los nitritos (NO<sup>2-</sup>) y los nitratos (NO<sup>3-</sup>) [72]. La vida media del NO es breve, entre unos 8 y 10 segundos, lo que limita su campo de acción. Sin embargo, sus efectos biológicos pueden extenderse debido a la formación de productos estables y activos, cuando reacciona con proteínas y otras moléculas. Una vez sintetizado, el NO puede difundir en la misma célula o en las células vecinas, donde se puede unir al grupo hemo de la guanilato ciclasa estimulando la producción de GMPc [73]. El GMPc activado puede después unirse específicamente a proteínas diana, incluidos factores de transcripción, quinasas y fosfodiesterasas para provocar efectos diversos. El NO también puede actuar de una forma independiente al GMPc, por ejemplo modificando directamente a proteínas o contribuyendo a la oxidación de

proteínas y lípidos, lo que incrementa el número y la complejidad de los roles potenciales del NO en situaciones fisiológicas y patológicas [74]. Además, las especies reactivas del oxígeno también pueden mediar en las funciones celulares. El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) se forma por la combinación del NO y el anión superóxido (O<sup>2-</sup>), y contribuye en diversos eventos destructivos, incluida la apoptosis [75]. El NO también puede eliminarse por reacción con oxihemoglobina hasta formar nitratos [75]. Existen numerosos factores que determinan el papel dual fisiológico y/o patológico del NO, entre ellos, uno de los más importantes es la concentración local del mediador.

En cuanto a las enfermedades articulares, el NO es considerado como un factor catabólico claramente involucrado en la destrucción del cartílago articular a través de diferentes mecanismos, incluyendo apoptosis y perpetuación de la expresión de citoquinas proinflamatorias [76, 77]. El NO puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz del cartílago, tales como el colágeno y proteoglicanos, aumentar la actividad de las MMP, incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reducir la síntesis del IL-1Ra, inhibir la proliferación celular, etc. [78]. Estos hechos afianzan la hipótesis de que el NO es un factor proinflamatorio y proapoptótico que, cuando se presenta en exceso, es perjudicial para la articulación y contribuye en la patogenia de la artrosis.

### **2.3 Las óxido nítrico sintasas.**

El óxido nítrico se sintetiza en las células de mamíferos gracias a la intervención de una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Se conocen tres isoformas distintas de la NOS, codificadas en diferentes genes, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Los estudios iniciales indicaban que la nNOS y la eNOS se expresaban de forma constitutiva en el sistema nervioso y en el endotelio vascular, respectivamente, sintetizando una pequeña cantidad de NO (del orden de pmoles) de forma calcio dependiente, en condiciones basales y bajo estimulación, y que la iNOS se inducía solo tras la estimulación con endotoxinas o con algunas citoquinas proinflamatorias, produciendo grandes cantidades de NO (2 o 3 órdenes de magnitud más que las otras dos enzimas) de forma independiente de calcio [79-84]. Estudios más recientes demostraron que las expresiones de la eNOS y de la nNOS se pueden regular [85-88], y que la iNOS se puede expresar constitutivamente incluso bajo condiciones fisiológicas [89, 90].

La nNOS, además de en el sistema nervioso se localiza en otros tejidos como el músculo esquelético. La eNOS se localiza en diferentes tejidos y células como el endotelio vascular, miocardio, plaquetas e hipocampo. Finalmente se ha descrito la presencia de la isoforma inducible en macrófagos, músculo cardíaco, hepatocitos, glía, condrocitos, etc.

### **2.4 Las Citoquinas.**

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica. Estos mediadores controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros

procesos biológicos. La producción excesiva de citoquinas conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas [91].

#### 2.4.1 IL-1 $\beta$ y el TNF- $\alpha$ : Dos citoquinas proinflamatorias.

Dentro de las citoquinas proinflamatorias, se encuentran la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estas citoquinas pueden ser sintetizadas por distintos tipos celulares y son responsables de la activación de un gran número de células. En la articulación artrósica ambas participan en la destrucción del cartílago [92]. En condrocitos y sinoviocitos estas citoquinas son capaces de inducir su propia producción al tiempo que inducen la síntesis de otros mediadores como la IL-6, la IL-8 y el factor inhibidor de leucocitos [78, 93]. Ambas citoquinas son capaces de incrementar la expresión de la COX-2 y de la iNOS, y por lo tanto, de los mediadores inflamatorios que sintetizan estas dos enzimas, la PGE<sub>2</sub> y el NO [78, 93]. También son capaces de aumentar la producción de otras moléculas implicadas en el desarrollo de la enfermedad, como proteasas, quimioquinas y moléculas de adhesión. Finalmente, tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  disminuyen la síntesis de proteoglicanos y de colágeno tipo II en los condrocitos y aumentan en cambio la expresión de los colágenos tipo I y III [78, 93]. La suma de estos efectos tiene como resultado final la puesta en marcha del programa catabólico que se produce en la artrosis.

La familia de la IL-1 incluye once miembros, aunque solo cuatro (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1Ra) están implicados en procesos patológicos [94]. Existe una fuerte homología entre la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , las dos surgen de precursores de aproximadamente 31 KDa que se rompen para generar proteínas maduras de 17 KDa. La IL-1 $\alpha$  es una molécula inicialmente unida a la membrana y podría ejercer su función mediante la interacción directa célula-célula [95]. La IL-1 $\beta$  es liberada al medio extracelular y se activa gracias a una proteasa denominada enzima convertora de IL-1 $\beta$ , o caspasa-1, que está incrementada tanto en el cartílago como en la membrana sinovial artrósica [96]. La IL-1 $\beta$  produce diferentes efectos biológicos a través de su unión a receptores específicos, conocidos como IL1R. Se han identificado tres variantes, IL-1R tipo I (IL-1RI, 80 KDa), IL-1RII (68KDa) y IL-1RAcP [97]. Tanto el receptor tipo I como el tipo II se encuentran incrementados en sinoviocitos y en condrocitos artrósicos [98, 99], lo cual hace a estas células más sensibles a la IL-1 $\beta$ .

La familia del TNF consta por lo menos de 18 miembros que exhiben un 15-25% de homología en su secuencia de aminoácidos. El TNF- $\alpha$  se sintetiza como precursor inactivo de unos 26 KDa unido a la membrana; es necesaria la actuación de la enzima convertora de TNF- $\alpha$  (TACE) para su activación [100]. Esta enzima se encuentra elevada en el cartílago de pacientes con artrosis y es uno de los mediadores implicados en la destrucción de la matriz extracelular [101]. Cuando el TNF- $\alpha$  está activo forma homo trímeros que se unen a sus receptores de membrana. Hasta la fecha se ha descubierto dos receptores, TNF-R1 (55 KDa) y TNF-R2 (75 KDa) [100]. El TNF-R1 parece ser el más implicado en la actividad del TNF- $\alpha$  en la artrosis y está incrementado en condrocitos artrósicos [98].

Berembaum y colaboradores demostraron que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de COX-2 sin la concomitante producción de PGE<sub>2</sub> en condrocitos de conejo, mientras que la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  actúan sinérgicamente en la liberación de PGE<sub>2</sub> [102]. Aunque las dos citoquinas tienen un perfil proinflamatorio similar, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  tienen

mecanismos de acción diferentes sobre los condrocitos. Según diferentes estudios realizados en animales, se puede concluir que la IL-1 $\beta$  es un mediador más poderoso que el TNF- $\alpha$  en cuanto a la destrucción del cartílago [102, 103].

## 2.5 El factor de crecimiento del endotelio vascular.

Aunque el cartílago humano es un tejido avascular en condiciones fisiológicas, se puede observar un fenómeno de angiogénesis durante el proceso del desarrollo óseo endocondral. Además, la inflamación articular que ocurre en patologías como la artrosis puede llevar a la neovascularización del cartílago. En estas condiciones, la expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), juega un papel clave, no solo en el control de la angiogénesis, sino también en el metabolismo del condrocito.

El VEGF es conocido por ser un importante mediador de la angiogénesis. La familia del VEGF comprende al menos siete miembros: VEGF-A (usualmente llamado solo VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario PlGF [104-107]. Se conocen hasta siete isoformas de VEGF generadas por *splicing* alternativo, que se diferencian estructuralmente en el número de aminoácidos que las forman. Las cuatro isoformas más destacadas son VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>, de las cuales el VEGF<sub>165</sub> es la más abundante. Una de las diferencias más importante entre las isoformas es la afinidad por los receptores celulares y por la matriz extracelular [104, 108]. Se conocen tres receptores para VEGF, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 [109]. El papel fundamental de VEGFR2 es el desarrollo vascular, mientras que VEGFR1 podría ser un receptor señuelo. VEGFR3 es importante en el desarrollo de vasos linfáticos [109, 110].

La hipoxia, las citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el estrés mecánico modifican el fenotipo de los condrocitos en la artrosis [111], incluyendo un aumento en la expresión de VEGF [112, 113]. La hipoxia es el principal estímulo para la angiogénesis [114]. Más específicamente, una reducción en la tensión de oxígeno induce la expresión de VEGF a través del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  que activa la transcripción del gen de VEGF en células en hipoxia al unirse a un elemento de respuesta a hipoxia próximo al sitio de inicio de la transcripción [115, 116]. HIF-1 $\alpha$  y VEGF se localizan en los mismos lugares dentro de la articulación artrósica [117]. El aumento en la expresión de VEGF en los condrocitos con hipoxia depende de la vía p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), mientras que el aumento en la expresión de VEGF ocasionado por la IL-1 $\beta$  se realiza a través de la vía JNK (*Jun N-terminal kinase*), lo que indica que la inflamación y la hipoxia regulan la expresión de VEGF en condrocitos a través de diferentes vías de señalización [118]. El aumento en la expresión de VEGF ocasionado por el estrés mecánico podría estar mediado por la activación de HIF-1 $\alpha$  [119], aunque los mediadores inflamatorios también pueden contribuir en la estimulación de los condrocitos a causa de un estrés mecánico [25].

A pesar de que la expresión de VEGF es fundamental en el desarrollo del hueso endocondral neonatal, generalmente no se encuentran en el cartílago articular humano adulto en condiciones fisiológicas [120, 121]. Sin embargo, recientes investigaciones han puesto de manifiesto la expresión de VEGF en el cartílago de enfermos con artritis y artrosis. Por ejemplo, los condrocitos y el cartílago de pacientes con artrosis tienen una expresión de VEGF



aumentada en comparación con la encontrada en individuos sanos [122-125]. También se encuentra una elevada expresión de VEGF en la membrana sinovial de pacientes con artrosis, acompañada de angiogénesis e inflamación [126]. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que VEGF puede estar implicado en el desarrollo de la artrosis aún no se comprende con claridad. Algunos autores piensan que la angiogénesis durante la artrosis podría contribuir a agravar algunas de las características más importantes de esta patología como la pérdida del cartílago articular, la inflamación sinovial, la fibrosis, el remodelado del hueso subcondral y la formación de osteofitos [56]. La angiogénesis está muy regulada en condiciones normales [127] por varios factores activadores e inhibidores [128]. En condiciones normales, los condrocitos secretan péptidos antiangiogénicos e inhibidores de algunas proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular [129], lo que podría explicar por qué el cartílago es un tejido avascular normalmente. Durante la artrosis, VEGF está presente en la invasión de vasos sanguíneos en el remodelado y la osificación del cartílago hipertrófico [112]. En la articulación VEGF puede ser expresado por osteoblastos, condrocitos hipertróficos, y condrocitos articulares de las capas más superficiales durante la artrosis, así como por macrófagos y fibroblastos de la membrana sinovial [124]. La expresión de VEGF aumenta en condrocitos artrósicos en comparación con controles normales [130], aunque este incremento en la expresión de VEGF se localiza predominantemente en las capas superficiales del cartílago, alejado de las zonas de la angiogénesis osteocondral [131].

Actualmente apenas existen estudios acerca del efecto que tiene la inhibición de la  $PGE_2$  en la articulación artrósica sobre la expresión de VEGF y la angiogénesis en general, a pesar de que uno de los tratamientos más comunes para tratar la artrosis es el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuya característica principal es la inhibición de este prostanoides. Estos efectos podrían ser similares a los efectos descritos en estudios relacionados con diferentes tipos de cáncer, los cuales vinculan la producción de prostaglandinas, en particular de  $PGE_2$  con un incremento en la angiogénesis [132, 133], sugiriendo una relación entre COX-2 y VEGF, ya que existe una correlación entre ambos mediadores [132, 134]. Huang y colaboradores sugirieron un vínculo entre la producción COX-2,  $PGE_2$  y VEGF, posiblemente vía HIF-1 $\alpha$ , usando una línea celular de cáncer gástrico [132]. El aumento de VEGF que produce la COX-2 en determinados tipos de cáncer es inhibido por el uso de altas dosis de AINES [135, 136].

## **2.6 Sistema OPG/RANK/RANKL.**

El descubrimiento y la caracterización en la última década del siglo pasado del ligando activador del receptor del factor nuclear Kappa B (RANKL), una citoquina esencial para la activación osteoclástica, así como su receptor, RANK y su receptor señuelo soluble, la osteoprotegerina (OPG), ha definido un nuevo concepto molecular y celular sobre la biología del osteoclasto y la resorción ósea. Estos mediadores forman un sistema de citoquinas clave para la homeostasis del hueso en general [137-139]. Durante la artrosis, se producen cambios en el hueso subcondral ligados a la resorción y formación de hueso. El sistema OPG /RANK/RANKL, fundamental en el remodelado óseo, se expresa en varios de los tipos celulares presentes en la articulación. La regulación de este sistema durante la artrosis podría ser clave en el conocimiento de esta patología.

RANKL es una proteína de 317 aminoácidos que pertenece a la súper familia de los receptores de TNF y es sintetizada como proteína de membrana o proteína soluble. Se expresa en hueso, médula ósea y tejidos linfoides [140-142]. En el interior de la articulación RANKL se expresa en los precursores de los osteoblastos, en los osteoblastos maduros, en los condrocitos y en otras células de la articulación en presencia de citoquinas como IL-1 [137, 143]. La principal función de RANKL en la fisiología del hueso es la estimulación de la activación y diferenciación de los osteoclastos y la inhibición de su apoptosis [144].

RANK es una proteína que pertenece a la súper familia de los receptores del TNF y es sintetizada como una proteína transmembrana de 616 aminoácidos. Es considerada como el receptor natural de RANKL y también se expresa en varios tejidos y órganos como el músculo esquelético, el timo, el hígado, el colon, glándulas mamarias, la próstata, el páncreas y las células del linaje de los monocitos y macrófagos incluidos los precursores de los osteoclastos y los osteoclastos maduros, los linfocitos B y T, las células dendríticas, los fibroblastos, y los condrocitos articulares [144].

OPG es una proteína que pertenece a la súper familia de los receptores del TNF, aunque no es un receptor de membrana sino soluble [145]. Es sintetizada como una proteína de 401 aminoácidos que tras cambios intracelulares se reduce a 380 aminoácidos en su forma madura [144]. OPG se expresa en el pulmón adulto, el corazón, el riñón, el hígado, el timo, los ganglios linfáticos y la médula ósea, y es sintetizada por varias células incluyendo las estromales, los osteoblastos, células musculares lisas, linfocitos B, y los condrocitos articulares [146, 147]. La principal función de OPG es actuar como un receptor señuelo soluble para RANKL compitiendo con RANK; En consecuencia, OPG es un eficaz inhibidor de la activación y maduración de los osteoclastos *in vivo* e *in vitro* [139, 144, 148].

El mecanismo de acción del sistema OPG/RANK/RANKL en el hueso es el siguiente: Las células osteoblásticas expresan y sintetizan RANKL en sus dos formas, soluble y anclado a la membrana. El receptor natural de RANKL, RANK, se expresa en la superficie celular de las células pre-osteoclasticas y la interacción entre RANKL y RANK induce la diferenciación de las células pre-osteoclasticas y la formación de osteoclastos maduros multinucleados [139, 144, 148]. El tercer mediador del sistema, OPG, también es sintetizado por los osteoblastos y ejerce un efecto inhibitorio sobre el proceso de diferenciación de los pre-osteoclastos. OPG se une a RANKL e impide la interacción de RANKL con RANK, inhibiendo así la osteoclastogénesis [139, 144, 148]. De esta manera, podemos describir a RANKL como un mediador pro-resortivo y a OPG como un agente anti-resortivo.

Aunque este sistema es el principal modulador del remodelado del hueso, también se expresa en condrocitos [149, 150], donde su regulación y función siguen siendo en gran medida desconocidas. En el hueso subcondral artrósico, OPG y RANKL se regulan de diferente manera dependiendo de la cantidad de PGE<sub>2</sub> liberada por esas células [151, 152]. El efecto de la PGE<sub>2</sub> o la inhibición de su síntesis en la regulación de OPG y RANKL en el cartílago de pacientes con artrosis no se han descrito, a pesar de que la PGE<sub>2</sub> es uno de las principales dianas en el tratamiento contra la artrosis.

### 3. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ARTROSIS.

En ausencia de una cura definitiva, la terapia contra la artrosis se ha basado tradicionalmente en el control de la sintomatología de la enfermedad, centrándose en estrategias que redujeran el dolor y mejoraran la movilidad. En la actualidad, los tratamientos contra la artrosis tienen dos enfoques, el quirúrgico y el no quirúrgico. El tratamiento quirúrgico es generalmente considerado como la última alternativa, cuando los tratamientos no quirúrgicos han fracasado en el control del dolor y/o la función de la articulación afectada; Sin embargo, el tratamiento no quirúrgico debe comenzar desde el primer momento. Las modalidades terapéuticas desde el punto de vista no quirúrgico en el tratamiento de la artrosis son muy numerosas, incluyendo tanto tratamientos farmacológicos como no farmacológicos. En el 2006 Steinmeyer y colaboradores clasificaron los fármacos disponibles actualmente en: 1) Analgésicos; 2) AINES; 3) Glucocorticoides; 4) SYSADOAS; 5) Medicamentos hechos a base de plantas y 6) Agentes diversos [153].

A continuación describiremos los fármacos empleados en esta tesis, fármacos anti-artrósicos que inhiben la síntesis de PGE<sub>2</sub>.

#### 3.1 Los antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se encuentran entre los fármacos más comúnmente recetados en todo el mundo, con indicaciones en varios tipos de artritis, artrosis, dolor menstrual, dolores de cabeza y trastornos ortopédicos como fracturas.

Aunque los primeros AINES se empezaron a utilizar mucho antes, no fue hasta 1971 cuando John Vane descubrió el mecanismo de acción de la aspirina y de otros antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina (IND), lo que aumentó la capacidad para desarrollar nuevas terapias antiinflamatorias [154]. Los AINES tienen efectos analgésicos, antipiréticos, antiagregantes y antiinflamatorios. El principal mecanismo de acción de estos fármacos radica en la inhibición de la actividad de la COX, lo que provoca un bloqueo en la fase inicial de la cascada proinflamatoria de las acciones mediadas por los eicosanoides [154]. Los primeros AINES que se desarrollaron eran inespecíficos, inhibiendo tanto la COX-1 como la COX-2. Estos AINES presentan una serie de efectos adversos, sobre todo en la mucosa gástrica y en la función renal que se asociaron con la inhibición de la COX-1, ya que esta vía constitutiva regula varias funciones fisiológicas en el sistema gastrointestinal y en los riñones. Poco después, diversos investigadores focalizaron sus esfuerzos en desarrollar una nueva generación de AINES, los inhibidores selectivos de la COX-2, fármacos que podrían tener efectos analgésicos y antiinflamatorios equivalentes o superiores a los AINES tradicionales y que podrían reducir la prevalencia de los efectos secundarios adversos para el sistema gastrointestinal y los riñones [155-159].

El meloxicam (MXC) fue uno de los primeros inhibidores preferenciales de la COX-2 disponibles. Su selectividad se ha definido en estudios cinéticos, comparando su capacidad relativa de inhibir ambas isoformas con la de un gran número de AINES. En estos estudios, con el 80% de inhibición de la COX-2, el MXC bloquea el 25% de la actividad

de la COX-1, mientras que inhibidores no selectivos como el diclofenaco (DCF) y la indometacina (IND) inhiben la actividad tanto de la COX-1 como de la COX-2 [160]. Otro AINE no específico empleado en el tratamiento de la artrosis es el aceclofenaco (ACF), que parece no ser capaz de inhibir a la COX pero que interfiere directamente en la síntesis de las prostaglandinas tras ser metabolizado en su metabolito activo, el DCF.

La caracterización de la estructura tridimensional de la COX mediante estudios cristalográficos y de fluorescencia ha permitido el desarrollo de los COXIBS, que son capaces de inhibir la COX-2 sin modificar la actividad de la COX-1. El celecoxib (CBX) fue el primer COXIBS aprobado para el tratamiento de la artrosis y de la artritis reumatoide. Este fue seguido por otros inhibidores selectivos de la COX-2 como el rofecoxib. A pesar del éxito inicial tras la puesta en marcha de estos fármacos, surgieron dudas sobre sus efectos cardiovasculares adversos [161]. Algunos estudios demostraron que la inhibición selectiva de la COX-2 podría inclinar el equilibrio natural entre el protrombótico tromboxano  $A_2$  y la antitrombótica prostaciclina, incrementando potencialmente la posibilidad de un evento cardiovascular [162-164]. En abril del 2005 la agencia estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*/Administración de comida y fármacos) llegó a la conclusión de que los COXIBS incrementan el riesgo de eventos cardiovasculares y recomendó la suspensión de algunos fármacos como el valdecoxib. El celecoxib se mantuvo en el mercado americano pero con una advertencia que indicaba el riesgo de eventos cardiovasculares [165, 166]. Además, la FDA pidió a los fabricantes de los AINES que cambiaran el etiquetado de sus productos añadiendo que los eventos cardiovasculares adversos podrían ser un efecto general de esta clase de compuestos. La Agencia Europea del Medicamento (AEM) no estuvo de acuerdo con la FDA ni en la retirada del valdecoxib, ni en los cambios en el etiquetado de los COXIBS, basándose en el equilibrio entre beneficios y riesgos de los AINES [167, 168].

### **3.2 Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis.**

Los fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis (SYSADOAS, *Symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis*) son compuestos que se prescriben como fármacos en Europa y como suplementos nutricionales en Estados Unidos. Los SYSADOAS se usan en el tratamiento contra la artrosis ya que son capaces de paliar los síntomas de la artrosis (el dolor y la función articular), y parece que también retardan su progresión. Los SYSADOAS se empezaron a emplear porque a pesar del uso generalizado de los AINES en el control de la inflamación y del dolor que se observa en la artrosis, y del importante papel que desempeña la  $PGE_2$  en el desarrollo de la enfermedad, existe cierta controversia sobre si el uso crónico de inhibidores de la COX atenúa la destrucción del cartílago articular en la artrosis. Algunos estudios en animales muestran que el tratamiento con AINES no tiene ningún efecto protector contra la pérdida de cartílago [169, 170]. En contraste, otros estudios en animales aseguran que el tratamiento con AINES reduce la progresión del daño del cartílago [171]. Los resultados de diversos estudios clínicos también son dispares, algunos describen como los AINES no solo no protegen el cartílago sino que aceleran su destrucción [172], mientras otros encontraron efectos significativos del tratamiento con AINES sobre la progresión del daño en el cartílago [173, 174].

Los SYSADOAS, al contrario que los AINES, no son de acción rápida, y su eficacia clínica para paliar los síntomas de la artrosis como la función articular y el dolor sólo puede demostrarse unas semanas después del inicio del tratamiento [175]. Sus efectos pueden prolongarse durante un periodo significativo tras el cese del tratamiento, unos tres meses con administraciones orales y hasta nueve meses cuando se administra de forma intra-articular [175].

Los SYSADOAS incluyen compuestos como la N-Acetil Glucosamina (AcG), Sulfato de Glucosamina (SG) e Hidrocloruro de Glucosamina (HG), el Condroitin Sulfato (CS), la Diacereína (DC) y el Ácido Hialurónico.

Los SYSADOAS se empezaron a usar en un intento de recomponer los componentes que forman parte de la matriz extracelular del cartílago [176]. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los SYSADOAS en el tratamiento de pacientes artrósicos, pero debido a que no todos los trabajos han proporcionado resultados favorables existe mucha controversia sobre el papel de estos fármacos como agentes modificadores de la enfermedad. La DC reduce el estrechamiento del espacio articular en pacientes con artrosis de rodilla, aunque no parece modificar los síntomas [177]. Richy y colaboradores elaboraron una revisión de los estudios realizados en pacientes con artrosis de rodilla y observaron que la glucosamina mejoraba tanto las medidas sintomáticas como las estructurales mientras que el CS solo era capaz de mejorar la sintomatología [178]. Sin embargo, otro estudio demostró que el CS disminuía la probabilidad de que los pacientes desarrollaran artrosis erosiva [179]. También fueron interesantes, en lo que se refiere al dolor asociado a la enfermedad, los resultados procedentes de dos ensayos multicéntricos, los estudios GAIT [180] y GUIDE [181], que sugieren que los diferentes compuestos de glucosamina podrían tener efectos distintos [182].

### 3.2.1 El Sulfato de Glucosamina.

El sulfato de glucosamina (SG) es un amino-monosacárido esencial para la síntesis de glicolípidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (GAG), componentes esenciales de todos los tejidos conectivos, en los que contribuye dando fuerza, flexibilidad y elasticidad [183]. El SG presenta una actividad anabólica, estudios *in vitro* muestran que en condrocitos artrósicos humanos incrementa la síntesis de proteoglicanos [184], induce un aumento de en los niveles de expresión y síntesis de la proteína central de los agreganos y al mismo tiempo induce una disminución constante de la expresión de la MMP-3 [185], por lo que podría tener un efecto sobre la reparación y el mantenimiento de la estructura del cartílago [186].

En la actualidad este amino-monosacárido está siendo usado para tratar los síntomas de la artrosis humana, debido a sus efectos beneficiosos descritos en cuanto al control del dolor y de las anomalías estructurales que se asocian a esta patología [187, 188]. Además de su actividad condroprotectora, también se piensa que el SG puede producir efectos antiinflamatorios en la células articulares [189]. Aunque se han observado los efectos antiinflamatorios en varios tipos de cultivos celulares [190, 191] y en modelos animales [192], todavía no se conoce completamente su mecanismo de acción. Sin embargo, debido a que el SG inhibe parcialmente la activación de NFκB *in vitro*, lo que podría ser responsable de la disminución en la expresión de COX-2 y por lo tanto, de la síntesis de PGE<sub>2</sub> [191], esta vía podría explicar en cierta medida los efectos de este compuesto *in vivo* [187].

Los resultados de numerosos estudios y diferentes ensayos clínicos proporcionan un mecanismo molecular convincente para apoyar las observaciones clínicas que sugieren que el SG puede tener un efecto beneficioso en la prevención de la pérdida de cartilago articular en algunos pacientes con artrosis.

## **II. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS.

1. Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre la presencia de diferentes mediadores proinflamatorios en el cartílago artrósico. Para ello, analizaremos la expresión y la síntesis de los diferentes componentes de la ruta de las PGs, del NO y de diferentes citoquinas proinflamatorias en el cartílago de pacientes con artrosis de rodilla incluidos en un ensayo clínico y tratados con AINES durante 3 meses antes de la artroplastia total de rodilla. Analizaremos también el efecto de la inhibición en la síntesis de PGE<sub>2</sub> sobre la activación de estos mediadores proinflamatorios inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos artrósicos en cultivo.
2. Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre la presencia de mediadores neoangiogénicos en el cartílago artrósico. Para ello, analizaremos la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en el cartílago procedente de pacientes con artrosis de rodilla mencionados en el objetivo anterior. En estudios *in vitro* analizaremos también el efecto de la inhibición en la síntesis de PGE<sub>2</sub> sobre la presencia de mediadores neoangiogénicos. Para ello compararemos el efecto de diferentes fármacos, AINES (CBX, MXC, DCF e IND) y SYSADOAS (GS y CS), sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en condrocitos en cultivo. Además estudiaremos el efecto *in vivo* del tratamiento con SG sobre la síntesis de VEGF en el cartílago procedente de un modelo experimental de artrosis en conejo.
3. Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre mediadores del metabolismo óseo en el cartílago artrósico. Para ello, analizaremos la expresión y la síntesis de OPG, RANK y RANKL, proteínas responsables de remodelado óseo, en el cartílago procedente de pacientes con artrosis de rodilla incluidos en un ensayo clínico, tratados con AINES. Analizaremos también si la PGE<sub>2</sub> modula de forma directa la síntesis de estos factores por los condrocitos artrósicos en cultivo. Además estudiaremos la síntesis de estos mediadores en el cartílago procedente de un modelo experimental de artrosis en conejo.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. ESTUDIOS EN PACIENTES.

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

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

Los pacientes fueron clínicamente evaluados en tres ocasiones: en el momento del reclutamiento (T0), después del periodo de lavado (T1) y dos o tres días antes de la cirugía (T2). Se midieron los síntomas y la capacidad funcional de los pacientes siguiendo el índice de artrosis de las universidades de Western Ontario y McMaster (WOMAC) [193]. Este índice evalúa el dolor, la rigidez y la actividad física y social. Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

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

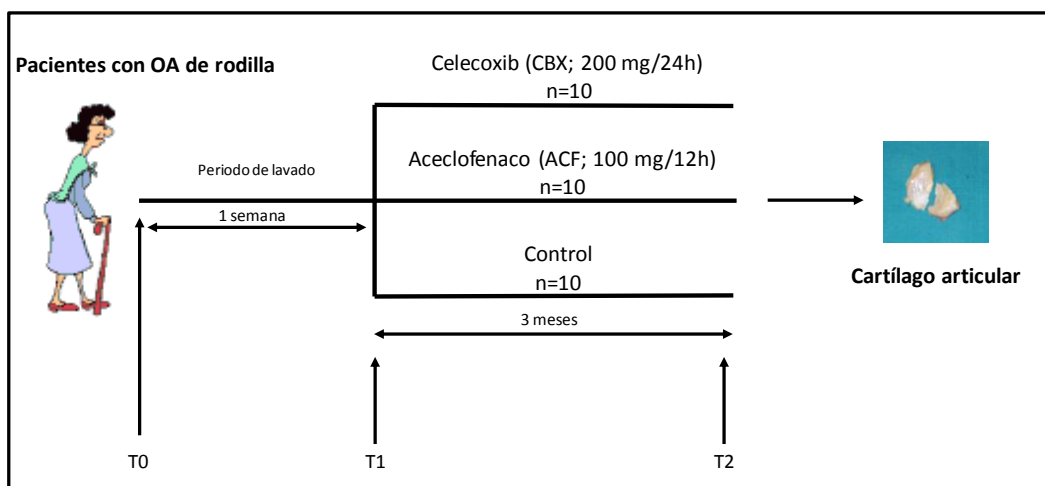


Figura 3. Diseño del protocolo clínico.

## 2. ESTUDIOS EN ANIMALES.

Se emplearon varios grupos de conejos albinos de raza Nueva Zelanda machos esqueléticamente maduros ( $\approx 3.5$  Kg de peso; 8 meses) suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España). Antes de iniciar con el ensayo, los animales se aclimataron durante dos semanas en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes a lo largo de todo el estudio, y consistían en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente, con acceso *ad libitum* al agua y comida [dieta comercial estándar para conejos (Panlab)].

Al comienzo del ensayo, a algunos de los conejos se les indujo OA de forma experimental mediante menisectomía parcial medial y sección del ligamento cruzado anterior (LCA) en ambas rodillas bajo anestesia general mediante inyección intramuscular de una combinación de 2 ml/Kg de xylacina (Rompun, Bayer) e hidrocloreuro de ketamina (Ketolar, Parque-Davis) en proporción 3:1 [194] y en condiciones de asepsia. Se realizó profilaxis antibiótica con cefonicid i.m. (100 mg/Kg) (Smith and Beecham) antes de la cirugía y los 3 días siguientes. Bajo estas condiciones de esterilidad, se abordó la rodilla mediante una incisión pararrotuliana interna. En primer lugar se incidió el ligamento menisco-tibial con tijeras de iris, se disecó la inserción periférica de la mitad anterior del menisco medial y, una vez liberada, se resecó. A continuación, se seccionó el LCA en su inserción femoral con bisturí del número 11. Finalmente la articulación se cerró por planos y se colocó un vendaje compresivo *Robert-Jones* con la rodilla a 90° durante cuatro días. Tras la cirugía se permitió que los animales se movieran libremente dentro de la jaula. Terminados los ensayos, los animales fueron sacrificados mediante la administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50 mg/Kg) (Pentotal, Abbott) previa anestesia general según acabamos de describir. Tras el sacrificio se recogieron muestras de cartílago articular que se congelaron en nitrógeno líquido para llevar a cabo estudios de expresión génica y de síntesis proteica. Parte de los conejos operados fueron tratados de forma preventiva con 1500 mg/día de sulfato de glucosamina (SG; Xicil, Rottapharm) desde dos semanas antes de la intervención hasta el final

del ensayo. Durante el ensayo, se sacrificaron conejos sanos y artrósicos a diferentes tiempos para comprobar la evolución de la artrosis y la expresión y la síntesis de determinados mediadores.

Todos los ensayos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la directiva vigente de la UE para la manipulación de animales de experimentación.

### 3. CULTIVOS CELULARES.

Los condrocitos se obtuvieron del cartílago articular procedente de pacientes con OA que presentaban evidencias clínicas y radiográficas de artrosis de rodilla de acuerdo con los criterios de la ACR, a los que se les practicó una artroplastia total de rodilla por cirugía convencional en el departamento de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España), después de obtener su consentimiento informado. El cartílago articular procedente del cóndilo femoral y del platillo tibial se diseccionó en un medio estéril. Los condrocitos se obtuvieron después de digerir el cartílago secuencialmente con pronasa (Roche, 10 g/L) durante 30 minutos y colagenasa tipo IV (Sigma, 1 g/L) durante 6 horas. La reacción se paró añadiendo medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, BioWhittaker) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) (BioWhittaker), 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomina y 2 mmol/L de glutamina (BioWhittaker). Las células se resuspendieron en medio DMEM con 10% de STF, se sembraron en placas de 100x20mm y se incubaron a 37°C en una estufa humidificadora con 5% CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron con células tras uno o dos pases y que fueron deplecionadas durante 48 horas antes de la realización de los experimentos en medio DMEM al 0% de STF.

Las células utilizadas en los experimentos constituían una población homogénea de células adheridas y con un fenotipo típico de condrocitos. Para la caracterización celular se realizó una tinción con Safranina O para la determinación de glicosaminoglicanos sulfatados y azul alcian-PAS para los glicosaminoglicanos totales. También se confirmó por inmunohistoquímica la presencia de colágeno tipo II y agreganos en los cultivos de condrocitos [195].

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

En cada experimento las células se crecieron y se mantuvieron quiescentes durante 48 horas en medio DMEM sin suero. Posteriormente, se estimularon durante diferentes periodos de tiempo con IL-1β (1 ó 10 U/ml, Immunogenex) o con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M, Cayman Chemical). Cuando se indica, las células se preincubaron durante 48 horas con sulfato de glucosamina (SG) en forma cristalina (Rottapharm) a diferentes concentraciones (2mM, 50µM ó 10µM), o con condroitin 6-sulfato (CS, 1 mg/ml ó 25 µg/ml, Sigma), y durante 60 minutos con celecoxib (CBX, 16<sup>-6</sup> M, Pfizer), meloxicam (MXC, 16<sup>-6</sup> M, Sigma), diclofenaco (DCF, 16<sup>-6</sup> M, Sigma) e indomethacina (IND, 16<sup>-6</sup> M, Sigma). Los compuestos se mantuvieron en el medio durante todo el periodo de incubación.

#### 3.2 Efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular.

Para comprobar que ninguno de los compuestos utilizados en los estudios *in vitro* alteraba la viabilidad celular se llevaron a cabo estudios mediante tinciones con azul de trypan en todas las condiciones experimentales utilizadas

en esta tesis. En ningún caso se observó que los compuestos empleados alterara la supervivencia celular, siendo la viabilidad celular superior al 90% en cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas. En todos los experimentos, las células se preincubaron con los diferentes fármacos antes de estimularlas. Además, ninguno de los fármacos produjo un efecto directo sobre la expresión génica de los mediadores estudiados en las células en estado basal a las concentraciones y periodos de incubación utilizados en el estudio.

#### **4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.**

Las muestras de tejido congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se pulverizaron mediante homogeneización mecánica en una cámara enfriada previamente con nitrógeno líquido y se resuspendieron después en 1 ml de TriPure® (Tripure Isolation Reagent, Roche). Las células se recogieron por raspado tras el periodo de incubación adecuado y se resuspendieron en 1 ml de TriPure®. Las proteínas totales de tejido y de células se extrajeron tal como se describe en el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se centrifugó la muestra. Esto separó la muestra en tres fases: una fase superior incolora (ARN), una interfase blanca (ADN) y una fase inferior rosa (Proteínas). Se recogió la fase superior, el ARN, y se procesó para su uso posterior. Entonces, con etanol 100% se eliminó la interfase blanca, el ADN, y finalmente las proteínas se precipitaron con isopropanol. Una vez extraídas las proteínas se resuspendieron en SDS 1X, al que se añadieron inhibidores de proteasas (10  $\mu\text{l/ml}$  CIP; 1  $\mu\text{l/ml}$  DTT; 10  $\mu\text{l/ml}$  PMSF). La concentración de proteínas totales se midió por el método del ácido bicinchonínico (BCA).

#### **5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

Tras el periodo de incubación adecuado, las células se recogieron por raspado, se resuspendieron en PBS (9.1 mmol/L fosfato sódico dibásico, 1.7 mmol/L fosfato sódico monobásico, 150 mmol/L de NaCl, pH 7.4) con Tritón X-100 (0.1%) y se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 100000 g durante una hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas citosólicas (sobrenadante) se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mientras que las proteínas de membrana (precipitado) se resuspendieron en buffer RIPA [50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 mM de ditioneitol (DTT), Tritón X-100 (1%), Na-deoxycholate (1%) y SDS (1%)]. La concentración de proteínas de membrana se midió por el método del BCA.

#### **6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA.**

Tras el periodo de incubación adecuado, las células se tripsinizaron y mediante un procedimiento estándar (NE-PER®, Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante se obtuvieron las fracciones nuclear y citosólica. Este reactivo se basa en un protocolo que permite la lisis progresiva de las células mediante la utilización de tres reactivos y una centrifuga. El primer reactivo provoca que las células se hinchen lo que causa tensión sobre la membrana celular. El segundo reactivo lisa la membrana celular lo que permite recoger las proteínas citoplasmáticas dejando el núcleo intacto. El tercer reactivo se utiliza para extraer las proteínas nucleares a partir del sedimento. Mediante este

método se consigue la proteína nuclear sin contaminación de ADN o de ARNm. La concentración de proteína nuclear y citosólica se midió por el método del BCA.

## 7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DEL CARTÍLAGO DE LOS CONEJOS.

Para la medida de proteínas, el cartílago de los conejos se pulverizó mediante homogeneización mecánica en una cámara enfriada previamente en nitrógeno líquido. El homogeneizado se resuspendió después en tampón de lisis frío [1% Nonidet P-40 (Sigma), 0.5% SDS, 0.1 mmol/EDTA, 1 mmol/L DTT y 1 mmol/L PMSF en PBS] y se transfirió a tubos eppendorf que se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos dos veces. La concentración de proteínas totales se determinó por el método del BCA.

## 8. WESTERN BLOT.

Cantidades similares de proteínas de todas las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS mediante electroforesis y se transfirieron a membranas de polivinilideno (Millipore). Las membranas se bloquearon posteriormente con un tampón 0.1 mmol/L Tris pH 7.4 y 0.1 mmol/L NaCl que contenía 0.3% de Tween-20, 5% de leche desnatada y 3% BSA (albúmina de suero bovino) durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos anti COX-2 (Santa Cruz), anti mPGES-1 (Cayman Chemical), anti iNOS (Affinity BioReagents), anti IL-1 $\beta$  (MBL), anti TNF- $\alpha$  (PrepoTech), anti OPG (Chemicon, R & D System), anti RANKL (PrepoTech), anti RANK (Santa Cruz), anti HIF-1 $\alpha$  (BD Transduction Laboratories) o anti VEGF (Abcam) a 4°C. Después de lavar, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante la incubación de las membranas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa utilizando un kit quimioluminiscente (ECL, Amersham) para detectar la señal.

## 9. INMUNOCITOQUÍMICA.

Los condrocitos se crecieron en portaobjetos de cultivo de 8 pocillos (Costar). Para estudiar la localización de la proteína RANKL, las células quiescentes se incubaron en presencia o ausencia de PGE2 ( $10^{-6}$  M), sulprostone ( $10^{-6}$  M), 11-deoxy Prostaglandin E<sub>1</sub> ( $10^{-6}$  M) o butaprost ( $10^{-6}$  M) durante 24 horas. Tras la incubación, las células se lavaron, se fijaron en metanol/acetona (50:50 v/v) durante 10 minutos a -20° C y se volvieron a lavar con tampón fosfato salino (PBS). Los condrocitos se incubaron después con albumina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS durante 1 hora a 37° C. El anticuerpo frente a RANKL (Prepotech) fabricado en conejo se usó como anticuerpo primario a una dilución 1/100 en PBS con 3% de BSA durante toda la noche a 4° C. Después varios lavados, las células se incubaron con una dilución 1/200 de un anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra (Sigma) marcado con FITC. Los controles se incubaron con suero no inmune o con el anticuerpo secundario únicamente. Las preparaciones se montaron en solución de glicerol y se visualizaron en un microscopio confocal digital.

## 10. MEDIDA DE PGE<sub>2</sub>.

Tras el periodo de incubación adecuado, el medio de cultivo de los condrocitos (cultivados en placas de 96 pocillos, a 50.000 células/pocillo en 150 µl de medio) se recogió y se guardó a -80°C hasta su análisis. La concentración de PGE<sub>2</sub> se determinó mediante un inmunoensayo enzimático (EIA) (Assay Designs Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 11. MEDIDA DE NITRITOS.

Para la determinación de los niveles de nitritos, las células quiescentes se incubaron durante 24 horas con IL-1β (10 u/ml) sola o con los fármacos utilizados en cada caso. Al finalizar el periodo de incubación, se recogió el medio procedente de los cultivos de condrocitos (cultivados en placas de 24 pocillos en 300 µl de DMEN 0%) y se almacenó a -80° C para su posterior análisis. La cuantificación de nitritos en el medio de cultivo se llevó a cabo por el método de Griess [196]. Brevemente, 50 µl del medio de cultivo celular se incubaron con 50 µl de reactivo de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamide dihydrochloride en 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro y se calculó la concentración de las muestras utilizando una curva estándar realizada con diluciones seriadas de una solución de nitrito sódico (Fluka).

## 12. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

El ARN total de tejido y de células en cultivo se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo en medio ácido [197]. Las muestras de tejido congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C se pulverizaron mediante homogeneización mecánica en una cámara congelada y se resuspendieron después en 1 ml de TriPure® (Tripure Isolation Reagent, Roche). Las células se recogieron por raspado tras el periodo de incubación adecuado y se resuspendieron en 1 ml de TriPure®. El ARN total de tejido y de células se extrajo tal como se describe en el protocolo del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó por medida de absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 mg/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm era cercana a 2, indicando la ausencia de contaminación proteica.

## 13. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL.

Mediante el kit ADNc (Applied Biosystems), se retrotranscribió 1 mg del ARN total del cartílago de los pacientes o de los condrocitos humanos procedentes de cultivos celulares para obtener ADNc total utilizando 2.5 u/ml de una transcriptasa reversa. El ADNc se almacenó para su posterior análisis. La cuantificación del ARN específico se realizó usando un equipo de PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el Sistema de Detección de secuencia ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Las sondas TaqMan FAM específicas para COX-2, mPGES-1, EP1, EP2, EP3, EP4, iNOS, IL-1β, TNF-α, OPG, RANKL, RANK, HIF-1α y VEGF se adquirieron en Applied Biosystems. También se utilizó un ensayo prediseñado de ARN ribosomal 18S (ARNr) (Applied Biosystems) como control endógeno. Después de comprobar la eficacia de la reacción de amplificación para todos los genes estudiados, así como para el control

endógeno de ARNr 18S, se calcularon las diferencias utilizando el ciclo umbral (Ct) y se usó el método del Ct comparativo para la cuantificación relativa. El ARNm de los diferentes genes estudiados se normalizó con respecto al ARNr 18S en cada pocillo, y el valor de cada paciente o punto experimental para la expresión de cada gen se normalizó con respecto al valor calibrador (se eligió uno de los pacientes del grupo de CBX como calibrador = 1 y en el caso de los experimentos *in vitro*, se utilizó un punto experimental no estimulado como calibrador = 1). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

#### 14. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES.

Las muestras de cartílago articular procedentes del cóndilo femoral inferior de los pacientes incluidos en el estudio se decalcificaron en una solución de EDTA (EDTA 0.07%, tartrato NaK 0.014%, HCl 9.92 ml/100 ml de agua destilada) durante 1 mes y medio y a continuación se incluyeron en parafina. Para la realización de los estudios histopatológicos las muestras se cortaron en secciones de 4  $\mu$ m de grosor y a continuación se tiñeron con hematoxilina-eosina y azul alcian. El grado de lesión de tejido fue evaluado por dos observadores independientes de forma ciega y de acuerdo con la escala publicada por Mankin [198]. Esta escala evalúa las alteraciones morfológicas presentes en el cartílago articular independientemente de su etiología, analizando cuatro características del cartílago que se encuentran alteradas en la OA: estructura, celularidad, tinción de la matriz e integridad de la limitante basófila. Estas cuatro subescalas se evalúan independientemente tal como se muestra en la tabla 1. La puntuación total se obtiene tras la suma de la puntuación obtenida en cada una de la subescalas. La puntuación máxima es 14 puntos.

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

Tabla 1. Escala de Mankin para la valoración histopatológica del cartilago articular (Mankin HJ, 1971).



## 15. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE LOS CONEJOS.

Para la evaluación de la histopatología microscópica se utilizaron parte de los fémures extraídos en el sacrificio. Éstos fueron fijados durante 24 horas en paraformaldehído (4%), decalcificados en ácido fórmico (98%) durante 30 días, y posteriormente incluidos en parafina, con la superficie de carga del cóndilo medial femoral expuesta. Realizamos cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, que fueron desparafinados e hidratados para realizar las tinciones de hematoxilina-eosina y azul alcian. Las preparaciones se evaluaron de forma ciega por dos observadores independientes y de acuerdo a la escala publicada por *Mankin* [198] (Tabla 1).

## 16. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para la detección de OPG y de RANKL los cortes fueron desparafinados y rehidratados con concentraciones decrecientes de etanol. Se inhibió la peroxidasa interna con metanol- $\text{H}_2\text{O}_2$  3% y posteriormente los cortes se incubaron con tripsina [0.1% peso/vol. en  $\text{CaCl}_2$  (0.1%) pH 7] durante 15 minutos a 37° C. Tras esto, los cortes se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-OPG (St<sup>a</sup> Cruz) o anti-RANKL (St<sup>a</sup> Cruz) a una dilución 1:200 durante toda la noche en un ambiente húmedo. Después los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el sistema EnVision (Dako) y posteriormente se trataron con el cromógeno 3-3'-diamino-benzidina (DAB; Sigma). Los cortes de tejido se contrastaron con hematoxilina de Mayer (Sigma). Se realizaron controles negativos en paralelo sustituyendo el anticuerpo primario por suero normal de conejo no inmune.

## 17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados del densitometrado [unidades arbitrarias de densitometrado (UAD)] se expresan como n veces sobre el control. Los resultados de los estudios por PCR a tiempo real [unidades arbitrarias (UA)] se expresan como n veces sobre el calibrador. La concentración de  $\text{PGE}_2$  (pg/ml) y de NO ( $\mu\text{M}$ ) se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Todos los análisis estadísticos se desarrollaron utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows (SPSS Inc.). Los datos entre los diferentes grupos se compararon usando los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando fue necesario. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de la p fue inferior a 0.05.

## **IV. RESULTADOS**

## 1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.

Para abordar el primer objetivo de la tesis estudiamos el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre la síntesis de mediadores proinflamatorios en el cartílago artrósico. Numerosos trabajos experimentales y en pacientes, han demostrado que la síntesis de prostaglandinas, óxido nítrico y citoquinas está incrementada en el cartílago artrósico [5-8, 199], sin embargo, no se conoce el efecto directo de la inhibición de la PGE<sub>2</sub> sobre los condrocitos durante la artrosis. Para ello, en el cartílago de los pacientes con artrosis de rodilla incluidos en el ensayo clínico, utilizaremos dos inhibidores de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, uno inespecífico de la COX, el ACF, y otro selectivo de la COX-2, el CBX y estudiamos la expresión y síntesis de los diferentes componentes de la ruta de las PG y del NO y analizaremos la expresión de citoquinas proinflamatorias. Estudiaremos también el efecto de los AINES sobre la activación de estos mediadores proinflamatorios inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos procedentes de pacientes con artrosis.

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

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

Información basal de los pacientes	CBX (n=9)	ACF (n=7)	CONTROL (n=9)
Hombres	22%	14%	22%
Mujeres	78%	86%	78%
Edad	73 $\pm$ 5	71 $\pm$ 8	72 $\pm$ 8
WOMAC (EVA) Después del lavado T1	2240 $\pm$ 918	2807 $\pm$ 644	1966 $\pm$ 390
WOMAC (EVA) Anterior a la cirugía T2	1952 $\pm$ 908*	2536 $\pm$ 528*	2140 $\pm$ 378*
WOMAC (EVA) Diferencia T2-T1	-289 $\pm$ 308	-270 $\pm$ 359	144 $\pm$ 85

Tabla 2. Información basal de los pacientes. \*p<0.05 vs. Los datos del mismo grupo de pacientes en el momento T1.

La tabla 2 muestra las características clínicas y demográficas de los pacientes. Los síntomas y la funcionalidad de los pacientes se evaluaron varias veces, como se ha descrito en el apartado de métodos (T0, T1 y T2). Tanto los

pacientes tratados con ACF como los tratados con el CBX presentaban una disminución significativa del índice WOMAC en T2 en comparación con T1 ( $2536 \pm 528$  vs.  $2807 \pm 644$ ,  $1952 \pm 908$  vs.  $2240 \pm 918$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) (Tabla 2). Sin embargo, los pacientes CONTROL ( $2140 \pm 378$  vs.  $1966 \pm 390$ ,  $p < 0.05$ ) mostraban un incremento significativo en el índice WOMAC en el T2 comparado con el T1, lo que probablemente se debió a que no recibieron ningún tratamiento con AINES durante el estudio (Tabla 2).

## 1.2 Histopatología del cartílago articular de los pacientes.

Para el estudio histopatológico del cartílago articular se evaluaron muestras del cartílago articular, en secciones de tejido teñidos con hematoxilina-eosina o con azul de toluidina mediante la escala de Mankin. Las alteraciones histopatológicas que se encontraron se describen a continuación:

- **Alteraciones de la estructura:** En el cartílago articular de algunos de los pacientes incluidos en el estudio se describieron hendiduras o erosiones focales que alcanzaban la capa radial y que ocasionalmente llegaban hasta la zona de calcificación dejando expuesto el hueso subcondral. Sin embargo, en otros pacientes, se observaron irregularidades en la superficie con presencia de pannus y, en algunos casos, se describieron hendiduras que llegaban hasta la zona de transición del cartílago.
- **Alteraciones celulares:** El cartílago articular presentaba, independientemente del grupo estudiado, una densidad celular baja y clones celulares frecuentes que aparecían tanto en las capas superficiales como en las capas profundas del cartílago. En algunos pacientes aparecieron clones celulares frecuentes e hiper celularidad difusa, mientras que en otros pacientes se describieron pocas alteraciones celulares.
- **Alteraciones de la matriz:** En el cartílago articular se produjo una disminución de la tinción de la matriz que fue desde leve a moderada o desde moderada a severa dependiendo del paciente estudiado.

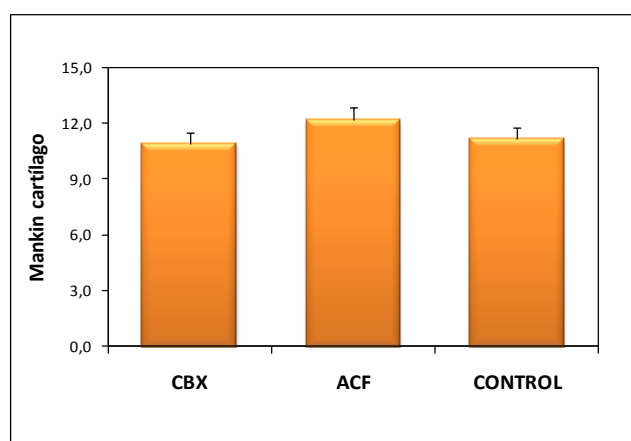


Figura 4. Histopatología del cartílago articular en los pacientes de los grupos tratados con CBX y ACF y CONTROL. Las gráficas de barras muestran la valoración del daño del cartílago articular de acuerdo a la escala de Mankin. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

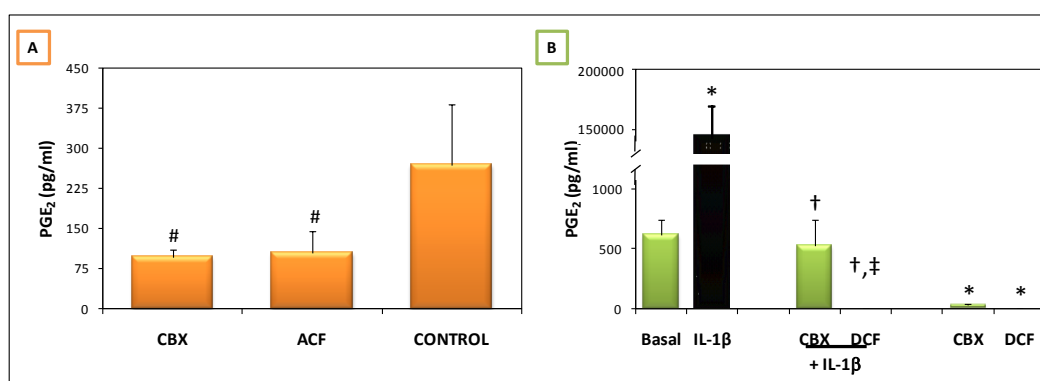
- **Alteraciones en la integridad de la limitante basófila:** Los pacientes tratados con el CBX presentaron menos irregularidades en la limitante basófila por el cruce de vasos que los pacientes tratados con ACF o los del grupo CONTROL.

A pesar de las alteraciones descritas anteriormente, no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos en ninguna de las subescalas estudiadas. En cuanto al Mankin total, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos incluidos en el estudio (Figura 4).

### 1.3 Efecto de los AINES sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

En primer lugar, quisimos comprobar la efectividad de los fármacos empleados en esta tesis sobre la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub>. Para ello, medimos la concentración de PGE<sub>2</sub> en las muestras de líquido sinovial obtenidas de los pacientes pertenecientes al ensayo clínico el día de la cirugía, como se explica en el apartado de métodos. La figura 5A muestra el resultado de la medida cuantitativa de la concentración de la PGE<sub>2</sub>. Como esperábamos, los tratamientos con CBX y ACF fueron capaces de disminuir de forma significativa la concentración de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial en comparación a los pacientes no tratados (CONTROL) ( $94.9 \pm 14.9$  vs.  $268.8 \pm 114.6$  y  $103.5 \pm 40.9$  vs.  $268.8 \pm 114.6$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). No existieron diferencias significativas en los niveles de la PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial entre los pacientes tratados con CBX o ACF.

Además, medimos el efecto de los AINES sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en condrocitos en cultivo obtenidos a partir del cartílago articular procedente de pacientes con artrosis. Preincubamos las células con CBX o con DCF durante una hora y posteriormente las estimulamos con IL- $\beta$ . La liberación de PGE<sub>2</sub> se midió 24 horas después de la estimulación. La IL-1 $\beta$  incrementó significativamente la concentración de la PGE<sub>2</sub>. Tal y como esperábamos, tanto el CBX como el DCF produjeron un descenso significativo en la producción de PGE<sub>2</sub> en las células no estimuladas, en comparación con las células en estado basal ( $24.2 \pm 12$  vs.  $618 \pm 128$  y  $0.0 \pm 0.0$  vs.  $618 \pm 128$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). Además, el CBX disminuyó significativamente el incremento en la liberación de la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1 $\beta$  ( $525 \pm 215$  vs.  $156195 \pm 20891$ ,  $p < 0.05$ ). El DCF también produjo un dramático descenso en los niveles de PGE<sub>2</sub> en los condrocitos tratados con la IL-1 $\beta$ , no sólo en comparación con las células estimuladas con la citoquina (N.D.), sino también en comparación con los condrocitos tratados con CBX (N.D.) (Figura 5B).

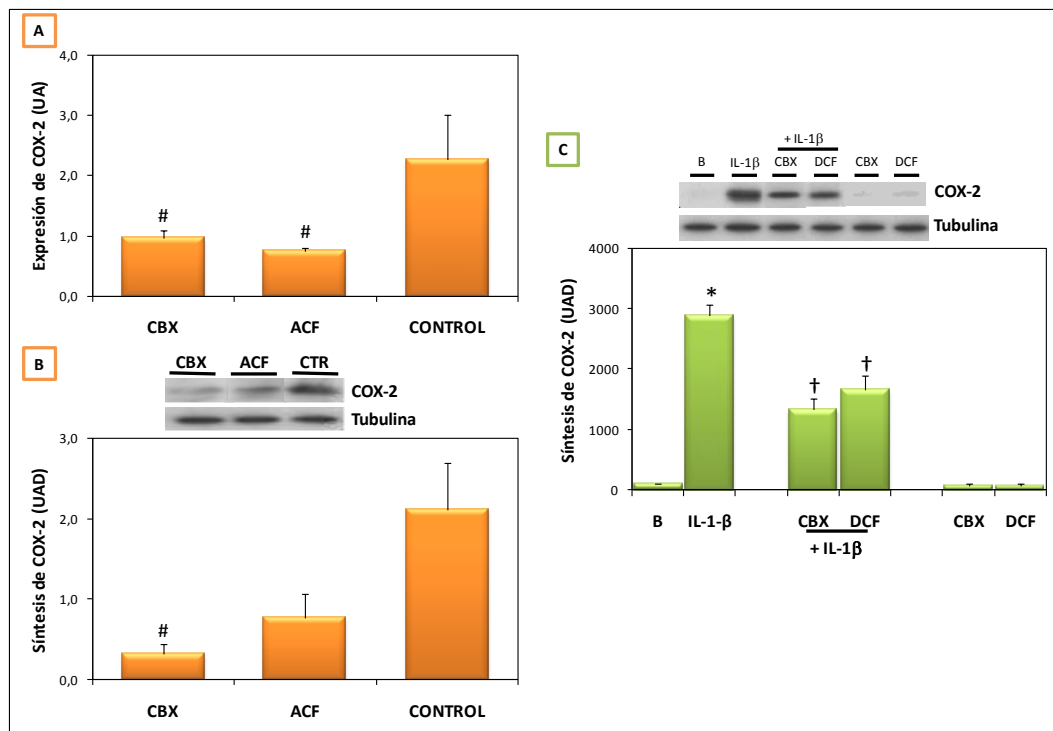


**Figura 5. (A) Concentración de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL. (B) Efecto del CBX y del DCF sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en condrocitos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX (10<sup>-6</sup> M) y DCF (10<sup>-6</sup> M), y estimulados después con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. Las concentraciones se muestran como Media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; \* $p < 0.05$  vs. Basal; † $p < 0.05$  vs. solo IL-1 $\beta$ ; ‡ $p < 0.05$  vs. CBX + IL-1 $\beta$ .**

#### 1.4 Expresión y síntesis de COX-2 en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

A continuación, medimos la expresión génica de la COX-2 en el cartílago procedente de los pacientes artrósicos incluidos en el estudio. Como se muestra en la figura 6, tanto los pacientes tratados con CBX como los tratados con ACF presentaron un descenso significativo en la expresión del gen COX-2 en comparación con el grupo CONTROL ( $1.0 \pm 0.1$  vs.  $2.3 \pm 0.7$  y  $0.7 \pm 0.1$  vs.  $2.3 \pm 0.7$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). No encontramos diferencias significativas entre los pacientes tratados con CBX y los tratados con ACF. Respecto a la síntesis proteica, los pacientes tratados con CBX presentaron un descenso significativo en la síntesis de COX-2 con respecto al grupo CONTROL ( $0.3 \pm 0.1$  vs.  $2.1 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ ), mientras que los pacientes tratados con ACF mostraron una tendencia similar aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Tampoco encontramos diferencias entre los pacientes tratados con CBX y los tratados con ACF (Figura 6).

En los estudios en condrocitos en cultivo, la IL-1 $\beta$  indujo un incremento en la síntesis proteica de la COX-2 de aproximadamente 29 veces. Tanto el tratamiento con CBX como con DCF inhibieron este incremento de forma significativa ( $1331 \pm 179$  vs.  $2887 \pm 181$  y  $1655 \pm 248$  vs.  $2887 \pm 181$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). Ninguno de los tratamientos de forma aislada modificó la síntesis de la COX-2 en comparación con las células en condiciones basales (Figura 6).

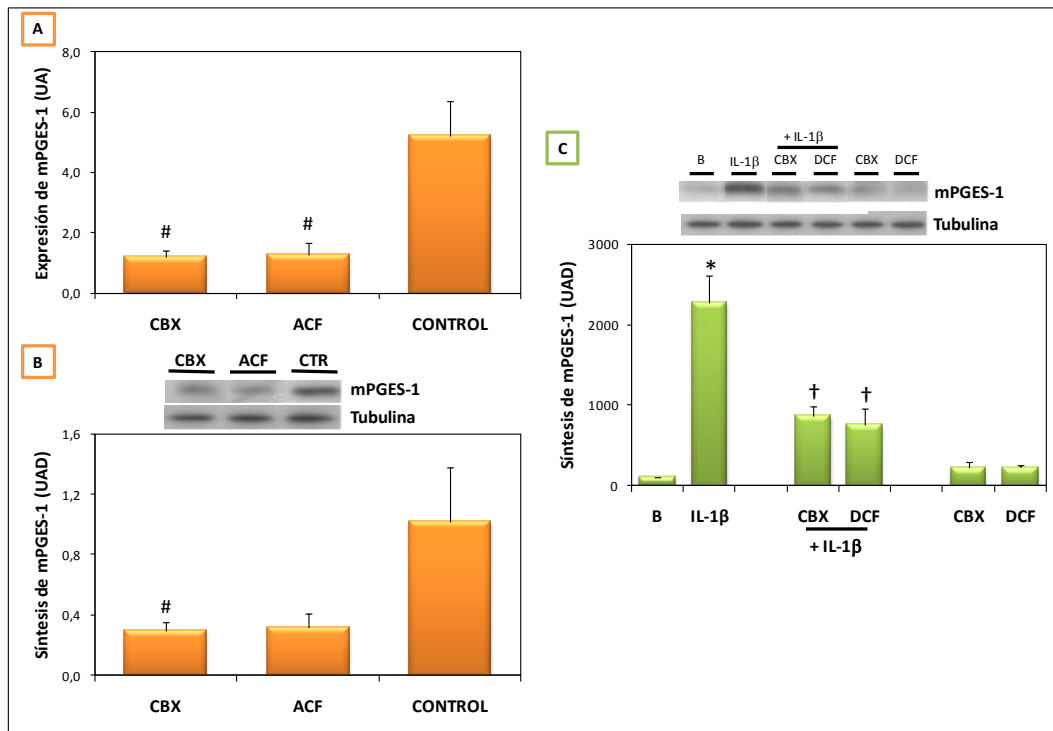


**Figura 6. Expresión y síntesis de la COX-2 en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 24 horas.** (A) Expresión génica de la COX-2 en el cartílago articular de los pacientes medida por PCR a tiempo real. (B y C) Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los pacientes correspondiente a las señales para COX-2 y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de la COX-2 expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina para los pacientes (B) y para las células en cultivo (C). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; \* $p < 0.05$  vs. Basal; † $p < 0.05$  vs. solo IL-1 $\beta$ .

### 1.5 Expresión y síntesis de la mPGES-1 en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

Posteriormente estudiamos la expresión y la síntesis de la mPGES-1 en el cartílago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. Tanto los pacientes tratados con CBX como los pacientes tratados con ACF mostraron un descenso estadísticamente significativo en la expresión génica de la mPGES-1 en comparación con los pacientes pertenecientes al grupo CONTROL ( $1.2 \pm 0.2$  vs.  $5.2 \pm 1.2$  y  $1.3 \pm 0.4$  vs.  $5.2 \pm 1.2$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). La diferencia entre los pacientes tratados con CBX y los tratados con ACF no fue estadísticamente significativa (Figura 7). El tratamiento con CBX disminuyó significativamente la presencia de la proteína mPGES-1 en el cartílago de los pacientes cuando se compararon con el grupo CONTROL ( $0.3 \pm 0.1$  vs.  $1.0 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ ). El tratamiento con ACF mostró una tendencia similar pero no fue estadísticamente significativa. No encontramos diferencias al comparar los dos tratamientos entre sí (Figura 7).

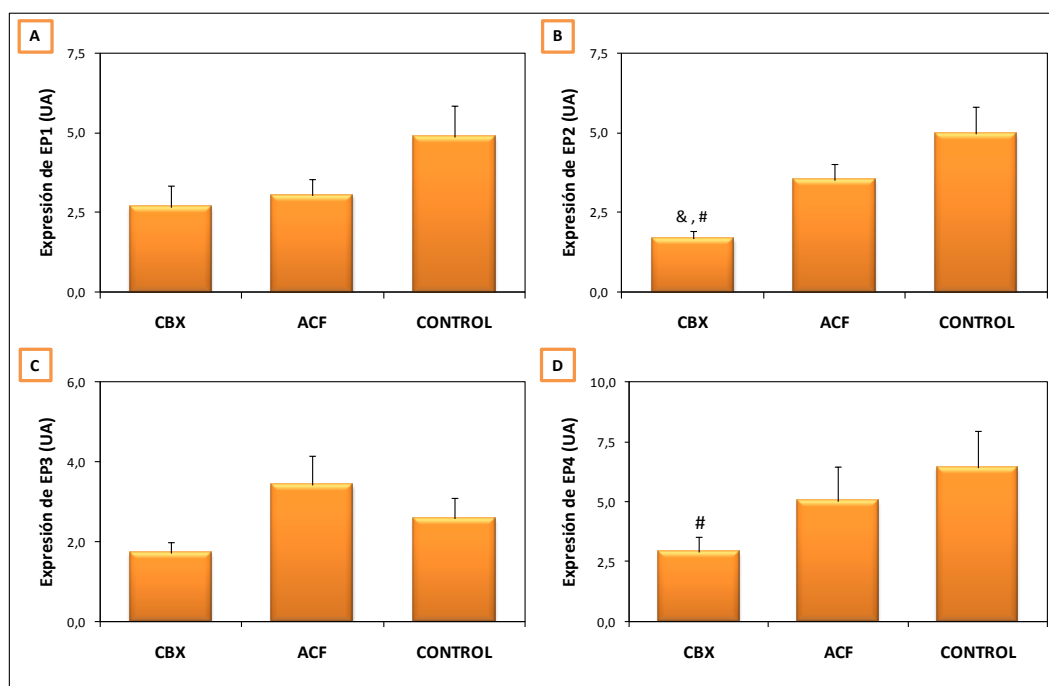
En los cultivos celulares, la IL-1 $\beta$  indujo un incremento significativo en la síntesis de la mPGES-1. Los dos AINES inhibieron dicho incremento [ $861 \pm 121$  vs.  $2265 \pm 339$  (CBX) y  $759 \pm 203$  vs.  $2265 \pm 339$  (DCF),  $p < 0.05$ ]. En los condrocitos no estimulados los tratamientos no modificaron la síntesis de la mPGES-1 en comparación con las células en estado basal (Figura 7).



**Figura 7. Expresión y síntesis de la mPGES-1 en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 24 horas.** (A) Expresión génica de la mPGES-1 en el cartílago articular de los pacientes medida por PCR a tiempo real. (B y C) Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los pacientes correspondiente a las señales para mPGES-1 y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de la mPGES-1 expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina para los pacientes (B) y para las células en cultivo (C). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; \* $p < 0.05$  vs. Basal; † $p < 0.05$  vs. solo IL-1 $\beta$ .

### 1.6 Expresión de los receptores EPs en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

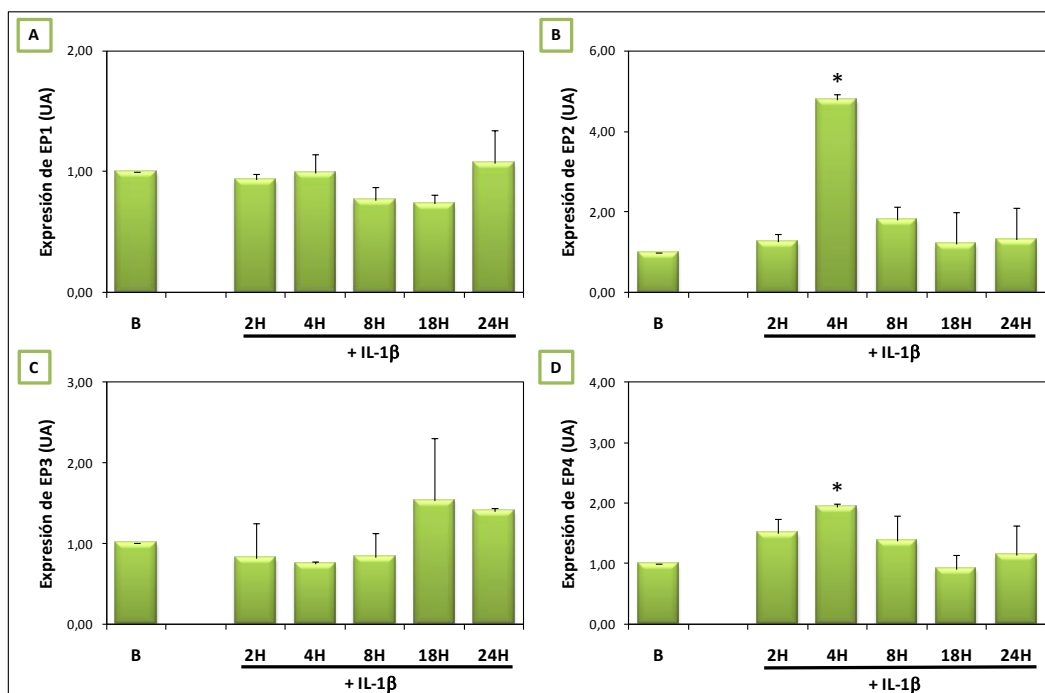
Nuestro siguiente objetivo fue estudiar los receptores celulares para la PGE<sub>2</sub>. Los estudios realizados por PCR a tiempo real demostraron que el cartílago artrósico expresa todos los receptores EPs descritos en humanos. El tratamiento con AINES no modificó la expresión génica de EP1 ni la de EP3. Sin embargo, los pacientes tratados con CBX mostraron un descenso significativo en la expresión génica de EP2 en comparación con los pacientes del grupo CONTROL ( $1.7 \pm 0.2$  vs.  $5.0 \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ) y también en comparación con los pacientes tratados con ACF ( $1.7 \pm 0.2$  vs.  $3.5 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ). La expresión génica de EP4 disminuyó en el grupo CBX en comparación con los pacientes del grupo CONTROL ( $2.9 \pm 0.6$  vs.  $6.4 \pm 1.5$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Expresión de los receptores EPs en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL.** Expresión génica de EP1 (A), EP2 (B), EP3 (C) y EP4 (D) medida por PCR a tiempo real. Datos expresados como media ± EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; & $p < 0.05$  vs. pacientes ACF.

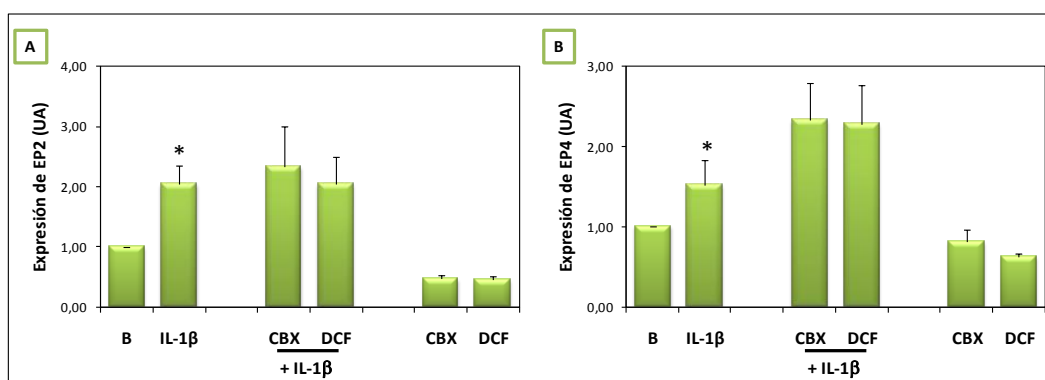
En los cultivos de condrocitos, estudiamos si la IL-1 $\beta$  es capaz de modificar la expresión de los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4. Para ello estimulamos los condrocitos con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) y analizamos la expresión de los genes.





**Figura 9. Efecto tiempo dependiente de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de EP1, EP2, EP3 y EP4 en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante diferentes periodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18, 24 horas) con IL-1 $\beta$  (10 u/ml). (A-D) Expresión génica de los diferentes receptores medida por PCR a tiempo real. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal.

Como se muestra en la figura 9, la IL-1 $\beta$  no modificó la expresión génica ni de EP1 ni de EP3 en comparación con las células no estimuladas. En cuanto a la expresión de los otros dos receptores, la presencia de la IL-1 $\beta$  incrementó de forma significativa la expresión tanto de EP2 como de EP4, en comparación a células no estimuladas, alcanzando un máximo de expresión a las 4 horas (Figura 9). Ni el CBX y el DCF modificaron este incremento en la expresión génica de EP2 y de EP4 en experimentos realizados a 4 horas de incubación. La exposición de estos AINES sobre células sin estimular no modificó la expresión de los EPs cuando se compararon con las células en condiciones basales (Figura 10).



**Figura 10. Expresión de EP2 y de EP4 en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX (10 $^{-6}$  M) y DCF (10 $^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 4 horas.** Expresión génica de EP2 (A) y de EP4 (B) medida por PCR a tiempo real. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal.

### **1.7 Expresión y síntesis de la iNOS en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo. Efecto de los AINES sobre la liberación de NO en condrocitos artrósicos en cultivo.**

A continuación estudiamos el efecto de la inhibición de PGE<sub>2</sub> sobre la iNOS. Respecto a la expresión génica, tanto los pacientes tratados con CBX como los tratados con ACF mostraron una disminución en dicha expresión cuando se compararon con el grupo CONTROL ( $0.6 \pm 0.1$  vs.  $1.1 \pm 0.2$  y  $0.3 \pm 0.1$  vs.  $1.1 \pm 0.2$  respectivamente,  $p < 0.05$ ), aunque no mostraron diferencias al compararlos entre sí. La síntesis proteica de la iNOS tuvo un comportamiento similar a la expresión génica, los pacientes con tratamientos mostraron una disminución estadísticamente significativa de la presencia de la proteína cuando se compararon con el grupo CONTROL [ $0.4 \pm 0.1$  vs.  $2.2 \pm 0.3$  (CBX) y  $0.3 \pm 0.1$  vs.  $2.2 \pm 0.3$  (ACF),  $p < 0.05$ ] y no mostraron diferencias cuando se compararon entre sí (Figura 11).

En los cultivos celulares la IL-1 $\beta$  indujo un incremento en la síntesis proteica de la iNOS estadísticamente significativo en comparación con las células sin estimular. Este incremento no fue modificado por ninguno de los AINES empleados. Los AINES tampoco modificaron la síntesis de la proteína en células no estimuladas cuando se compararon con las células en estado basal (Figura 11). Además, quisimos comprobar el efecto de los AINES sobre la liberación de NO en los condrocitos en cultivo. Para ello, medimos el NO liberado por las células 24 horas después de la estimulación de los condrocitos con IL-1 $\beta$ . Esta citoquina produjo un incremento significativo en la concentración del NO en el sobrenadante celular. Ni la presencia de CBX ni la del DCF consiguieron alterar la concentración de NO inducida por la IL-1 $\beta$ . Los AINES tampoco modificaron la síntesis de NO en las células no estimuladas cuando se compararon con las células en estado basal (Figura 11).

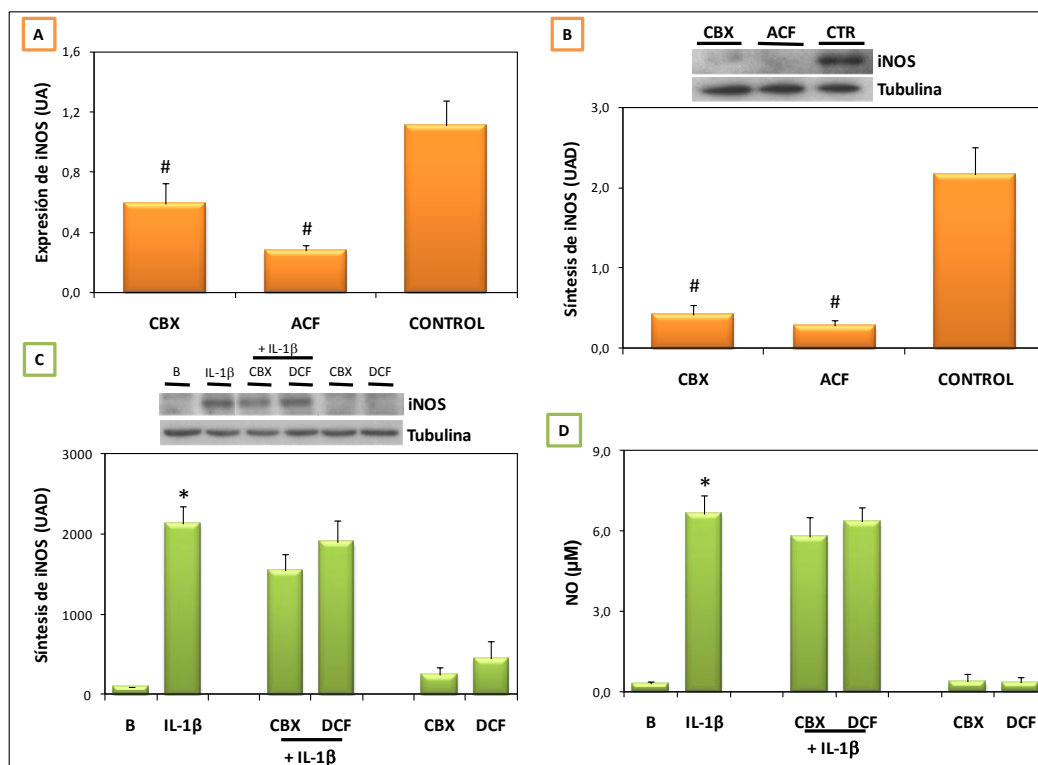


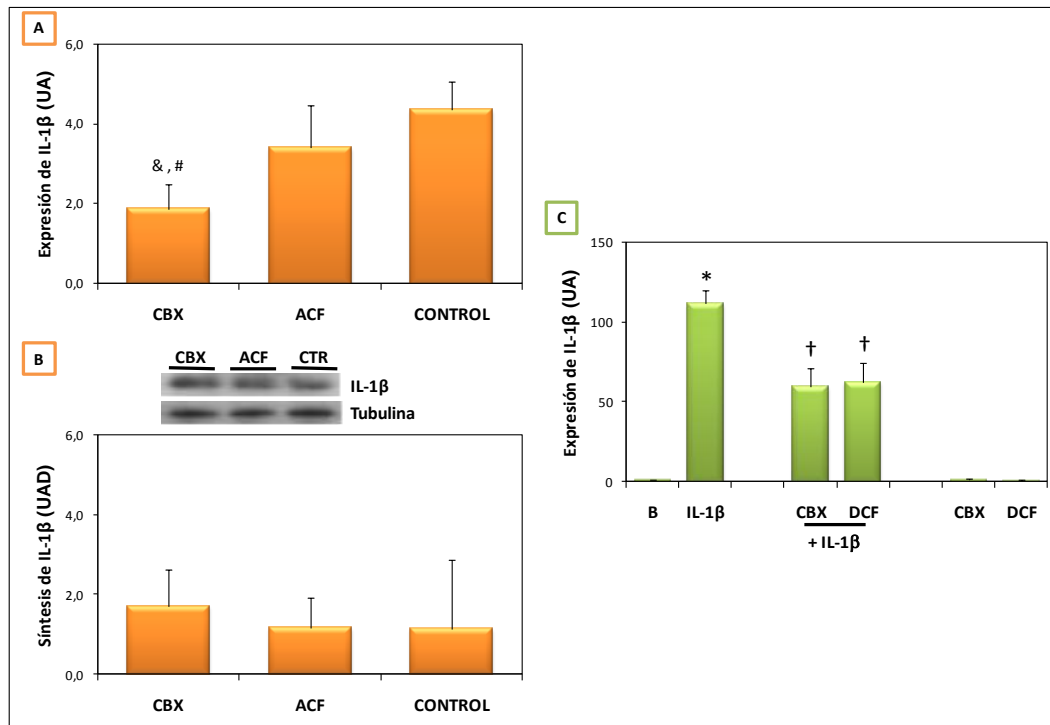
Figura 11. Expresión y síntesis de la iNOS en el cartilago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 24 horas. Efecto del CBX y del DCF sobre la liberación de NO en condrocitos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M), y estimulados después con IL-1 $\beta$  (10 u/ml) durante 24 horas. (A) Expresión génica de la iNOS en el cartilago articular de los pacientes medida por PCR a tiempo real. (B y C) Se muestra un estudio de Western blot representativo correspondiente a las señales para iNOS y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de la iNOS expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina para los pacientes (B) y para las células en cultivo (C). (D) Efecto del CBX y del DCF sobre la liberación de NO en condrocitos en cultivo. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; \* $p < 0.05$  vs. Basal.

### 1.8 Expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$ en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la expresión y la síntesis de la IL-1 $\beta$ . Los pacientes tratados con CBX presentaron una disminución estadísticamente significativa en la expresión génica de la IL-1 $\beta$  en comparación con el grupo de pacientes CONTROL ( $1.9 \pm 0.6$  vs.  $4.3 \pm 0.7$ ,  $p < 0.05$ ) y también en comparación con los pacientes tratados con ACF ( $1.9 \pm 0.6$  vs.  $3.4 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, los pacientes tratados con ACF no presentaron modificaciones en la expresión de esta citoquina en el cartilago. En términos de síntesis proteica, ni los pacientes tratados con CBX ni los tratados con ACF modificaron la producción de IL-1 $\beta$  en comparación con los pacientes pertenecientes al grupo CONTROL. Tampoco hubo diferencias al comparar los dos grupos con tratamientos entre sí (Figura 12).

En los cultivos de condrocitos artrósicos humanos, la estimulación con 10 u/ml de IL-1 $\beta$  ocasionó un incremento estadísticamente significativo en la expresión génica de la IL-1 $\beta$  tras dos horas de incubación. Tanto el tratamiento con CBX como el tratamiento con DCF previnieron este incremento en la expresión de la citoquina ( $59 \pm 12$  vs.  $111 \pm 9$  y  $62 \pm 12$  vs.  $111 \pm 9$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). No hubo diferencias entre los tratamientos entre sí. En los

condrocitos no estimulados los tratamientos no modificaron la expresión génica de la IL-1 $\beta$  observada bajo condiciones basales (Figura 12).

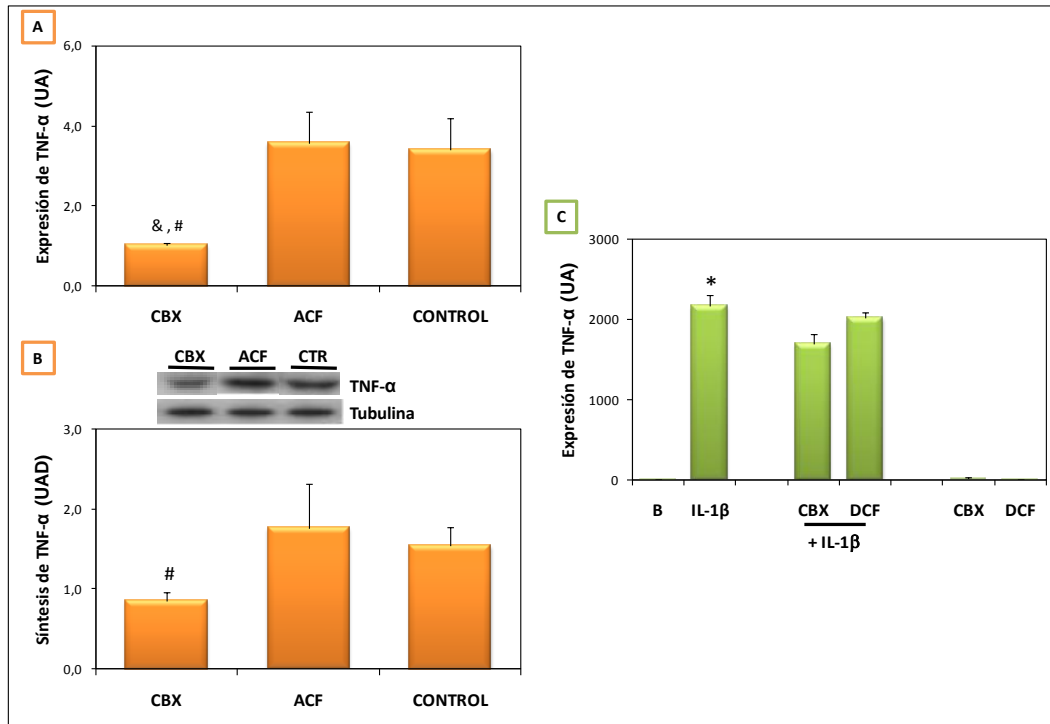


**Figura 12. Expresión y síntesis de la IL-1 $\beta$  en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 2 horas.** Expresión génica de la IL-1 $\beta$  en el cartílago articular de los pacientes (A) y en condrocitos en cultivo (C) medida por PCR a tiempo real. (B) Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los pacientes correspondiente a las señales para IL-1 $\beta$  y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de la IL-1 $\beta$  expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL; & $p < 0.05$  vs. pacientes ACF; \* $p < 0.05$  vs. Basal; † $p < 0.05$  vs. solo IL-1 $\beta$ .

### 1.9 Expresión y síntesis de TNF- $\alpha$ en pacientes con artrosis y en condrocitos artrósicos en cultivo.

Para finalizar esta primera parte de los resultados, estudiamos la expresión y la síntesis del TNF- $\alpha$ . De forma similar a lo ocurrido en la expresión génica de la IL-1 $\beta$ , los pacientes tratados con CBX mostraron una disminución significativa en la expresión génica del TNF- $\alpha$  en comparación con los pacientes de los grupos CONTROL ( $1.0 \pm 0.1$  vs.  $3.4 \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ) y ACF ( $1.0 \pm 0.1$  vs.  $3.6 \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ). En los pacientes tratados con ACF no hubo modificaciones en la expresión del TNF- $\alpha$  en comparación con los pacientes del grupo CONTROL. Respecto a la síntesis proteica del TNF- $\alpha$ , los pacientes tratados con CBX mostraron un descenso significativo en la presencia del TNF- $\alpha$  en el cartílago en comparación con el grupo de pacientes CONTROL ( $0.8 \pm 0.1$  vs.  $1.5 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias entre los pacientes tratados con ACF y el grupo CONTROL y tampoco entre los dos tratamientos (Figura 13).

En los cultivos celulares ni el CBX ni el DCF lograron modificar la expresión del TNF- $\alpha$  que se produjo en condrocitos estimulados con 10 u/ml de IL-1 $\beta$ . Los AINES tampoco modificaron en las células no estimuladas la expresión génica del TNF- $\alpha$  observada bajo condiciones basales (Figura 13).



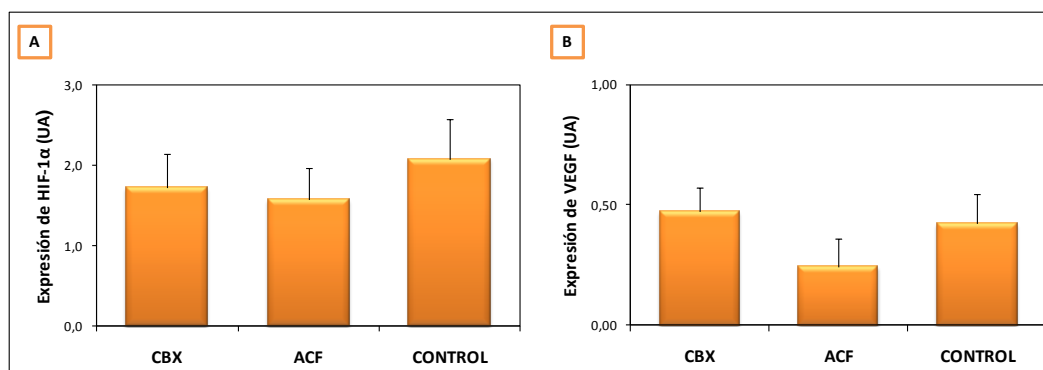
**Figura 13. Expresión y síntesis del TNF- $\alpha$  en el cartilago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo preincubados durante 60 min. con CBX ( $10^{-6}$  M) y DCF ( $10^{-6}$  M) y estimuladas después con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) durante 2 horas.** Expresión génica del TNF- $\alpha$  en el cartilago articular de los pacientes (A) y en condrocitos en cultivo (C) medida por PCR a tiempo real. (B) Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartilago articular de los pacientes correspondiente a las señales para TNF- $\alpha$  y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de la IL-1 $\beta$  expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p$ <0.05 vs. pacientes CONTROL; & $p$ <0.05 vs. pacientes ACF; \* $p$ <0.05 vs. Basal.

## 2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES ANGIOGÉNICOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.

En esta segunda parte de la tesis, estudiaremos cómo se modifica la expresión de algunos mediadores angiogénicos en el cartílago de los pacientes con artrosis de rodilla avanzada bajo el efecto de la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, para lo que emplearemos el cartílago procedente de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. Estudiaremos también el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena sobre la angiogénesis en condrocitos en cultivo comparando de forma simultánea el efecto de diferentes fármacos anti artrósicos como los AINES (CBX, MXC, DCF e IND) y los SYSADOAS (GS y CS) sobre la expresión y la síntesis de los mediadores angiogénicos en condrocitos procedentes de pacientes con artrosis. Además estudiaremos el efecto del tratamiento con GS sobre la síntesis de VEGF en el cartílago procedente de un modelo experimental de artrosis en conejo.

### 2.1 Expresión de HIF-1 $\alpha$ y VEGF en pacientes con artrosis.

En primer lugar, medimos la expresión de dos de los mediadores angiogénicos más importantes, HIF-1 $\alpha$  y VEGF, en el cartílago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico, para comprobar si el tratamiento a largo plazo con los AINES, que disminuye la síntesis de PGE<sub>2</sub>, modifica dicha expresión. Como se puede observar en la figura 14, ninguno de los tratamientos fue capaz de modificar la expresión de estos mediadores en comparación al grupo CONTROL. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamientos.

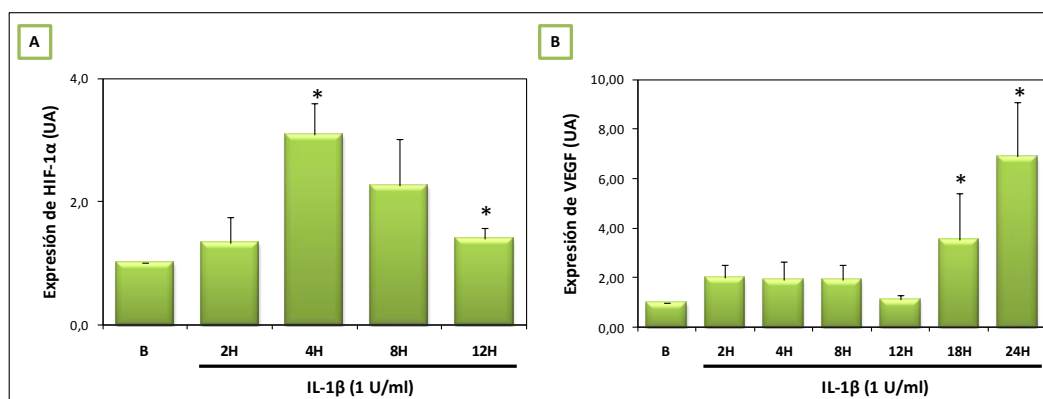


**Figura 14. Expresión génica de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX, ACF y CONTROL.** Expresión génica de HIF-1 $\alpha$  (A) y VEGF (B) en el cartílago articular de los pacientes medida por PCR a tiempo real. Datos expresados como media  $\pm$  EEM.

A continuación, decidimos estudiar el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y VEGF inducidas por la IL-1 $\beta$  en condrocitos en cultivo procedentes de pacientes con artrosis, para lo que incubamos estas células con diferentes fármacos usados en la terapia contra la artrosis, como se explica en la introducción.

## 2.2 Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la expresión de HIF-1 $\alpha$ y VEGF en condrocitos artrósicos en cultivo.

Nuestro primer objetivo en los experimentos *in vitro* fue estudiar el efecto tiempo-dependiente de la estimulación de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. Estimulamos las células con IL-1 $\beta$  (1 U/ml), durante diferentes tiempos de incubación, 0, 2, 4, 8 y 12 horas en el caso de HIF-1 $\alpha$  y 0, 2, 4, 8, 12, 18 y 24 horas en el caso de VEGF. En la figura 15, se muestra cómo la presencia de la IL-1 $\beta$  incrementó de forma significativa la expresión de los dos genes estudiados en los condrocitos. Observamos que el incremento en la expresión del factor nuclear HIF-1 $\alpha$  producido por la IL-1 $\beta$  alcanzó un efecto significativo a las 4 y a las 12 horas de incubación, siendo este mayor a las 4 horas (Figura 15). En el caso de VEGF, el incremento en la expresión ocasionado por la IL-1 $\beta$  se produjo a las 18 y 24 horas de incubación, siendo máximo a las 24 horas (Figura 15).



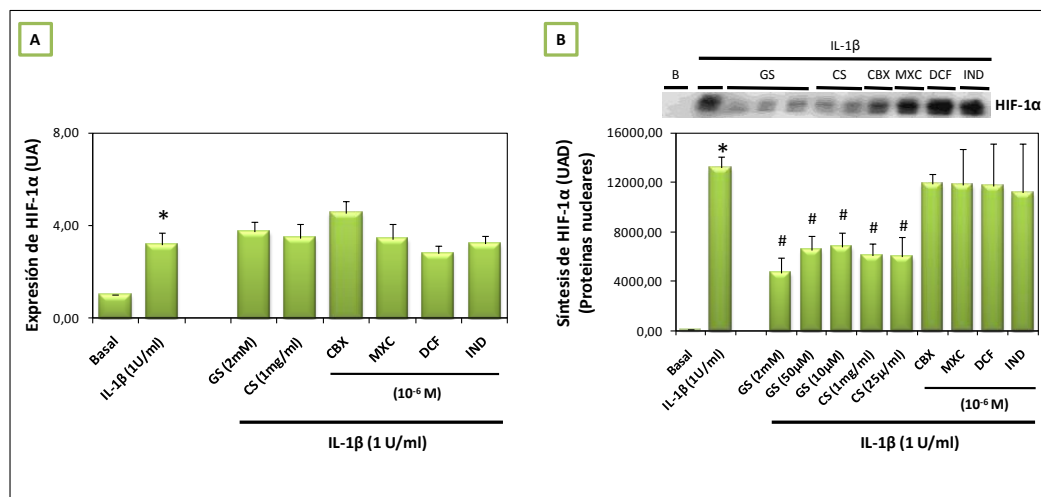
**Figura 15. Efecto tiempo dependiente de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión génica de HIF-1 $\alpha$  y VEGF en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante diferentes periodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18 y 24 horas) con IL-1 $\beta$  (1 U/ml). (A) Expresión génica de HIF-1 $\alpha$ ; (B) Expresión génica de VEGF. Expresiones génicas medidas por PCR a tiempo real. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal.

A continuación, tras conocer cual es el tiempo de máxima expresión de los mediadores angiogénicos, nos propusimos estudiar cual era el efecto de la presencia de varios inhibidores de la síntesis de la PGE $_2$  y de otros fármacos anti artrósicos en los condrocitos. Empleamos para ello varios AINES como el CBX, MXC, DCF e IND, que poseen un diferente perfil inhibitorio sobre las ciclooxigenasas. Además evaluamos simultáneamente el efecto de algunos SYSADOAS como el SG y el CS sobre la activación de los mediadores angiogénicos inducidos por la IL-1 $\beta$  en los condrocitos procedentes de pacientes con artrosis. Con el propósito de asegurar la posible eficacia de estos fármacos, las dosis de los SYSADOAS empleadas en la mayor parte de los experimentos fueron elevadas. La pretensión de nuestro grupo es continuar trabajando en esta línea, utilizando dosis que se correspondan con las empleadas en los tratamientos de pacientes con artrosis en la actualidad.

## 2.3 Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$ en condrocitos artrósicos en cultivo.

A continuación estudiamos el efecto de la depleción de PGE $_2$  endógena sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  en los condrocitos artrósicos humanos en cultivo. En estos experimentos, a las células se les retiró el suplemento de STF 48 horas antes de su estimulación con IL-1 $\beta$ . En ese momento, se añadió en el medio de cultivo los dos

SYSADOAS empleados y se mantuvieron durante las 48 horas. Una hora antes de la estimulación añadimos los cuatro AINES. Las células se estimularon con 1 U/ml de IL-1 $\beta$  durante 4 horas. Mediante la técnica de PCR a tiempo real, pudimos comprobar que ninguno de los fármacos empleados en estos experimentos conseguía reducir el aumento en la expresión génica de HIF-1 $\alpha$  provocado por la estimulación con IL-1 $\beta$  en los condrocitos (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se preincubaron durante 48 horas con GS y con CS y durante 1 hora con CBX, MXC, DCF e IND, y luego se estimularon durante 4 horas con IL-1 $\beta$ . (A) Expresión génica de HIF-1 $\alpha$ ; (B) Síntesis proteica de HIF-1 $\alpha$ ; Se muestra un estudio de *Western blot* representativo correspondiente a las señales para HIF-1 $\alpha$  y los análisis densitométricos de la presencia de HIF-1 $\alpha$  expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal; #  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ .

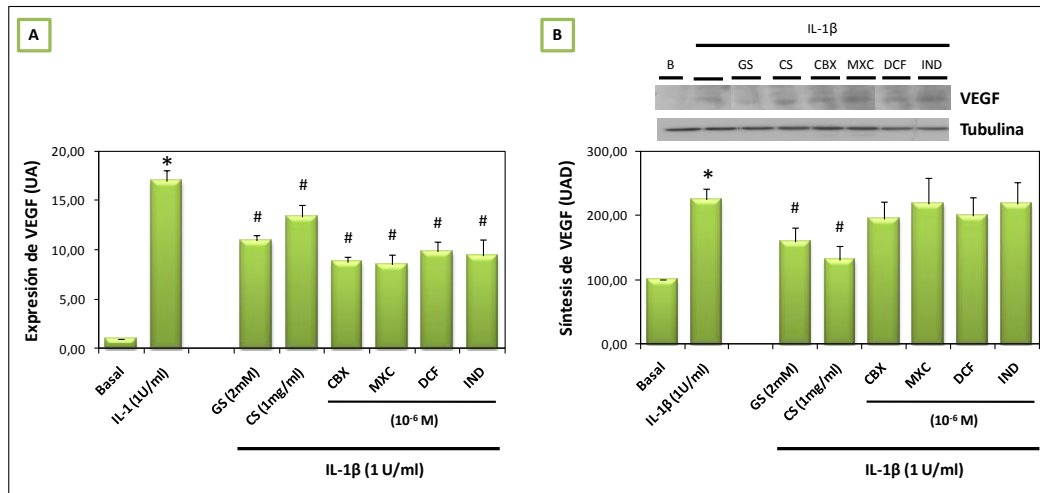
A continuación analizamos la síntesis proteica de HIF-1 $\alpha$  en extractos de proteína total. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los de la expresión génica, ya que ninguno de los fármacos anti artrósicos empleados consiguieron reducir el aumento en la síntesis de HIF-1 $\alpha$  provocado por la IL-1 $\beta$ . Ya que HIF-1 $\alpha$  es un factor nuclear, quisimos comprobar si algunos de los fármacos usados eran capaces de modificar la presencia de HIF-1 $\alpha$  en el núcleo. Para ello, como se describe en el apartado de métodos, extrajimos la proteína nuclear de los condrocitos y medimos la presencia de HIF-1 $\alpha$  mediante *Western blot*. En estos experimentos utilizamos los mismos fármacos, pero usamos varias dosis para cada SYSADOA. Como se puede observar en la figura 16, sólo el SG y el CS fueron capaces de inhibir la síntesis de HIF-1 $\alpha$  inducida por la IL-1 $\beta$  en los condrocitos. Ninguno de los AINES modificó de forma significativa los niveles de este factor nuclear.

#### 2.4 Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de VEGF en condrocitos artrósicos en cultivo.

Después evaluamos el efecto de la depleción de la PGE<sub>2</sub> endógena sobre la expresión y la síntesis de VEGF en los condrocitos procedentes de pacientes con artrosis. A diferencia de los resultados obtenidos con el factor HIF-1 $\alpha$ , todos los fármacos empleados consiguieron reducir de forma significativa el aumento en la expresión génica de VEGF provocado por la estimulación de las células con IL-1 $\beta$  (Figura 17). Para los estudios de proteína, empleamos un anticuerpo capaz de reconocer la isoforma 165 de VEGF, que como se explica en la introducción, es la más



abundante. En estos estudios, al igual que ocurría en el caso de HIF-1 $\alpha$ , sólo los SYSADOAS empleados en este estudio, el SG y el CS, consiguieron reducir el aumento en la presencia de VEGF<sub>165</sub> ocasionado por la estimulación de la citoquina proinflamatoria. Los AINES utilizados no tuvieron ningún efecto sobre la síntesis de VEGF<sub>165</sub> (Figura 17).

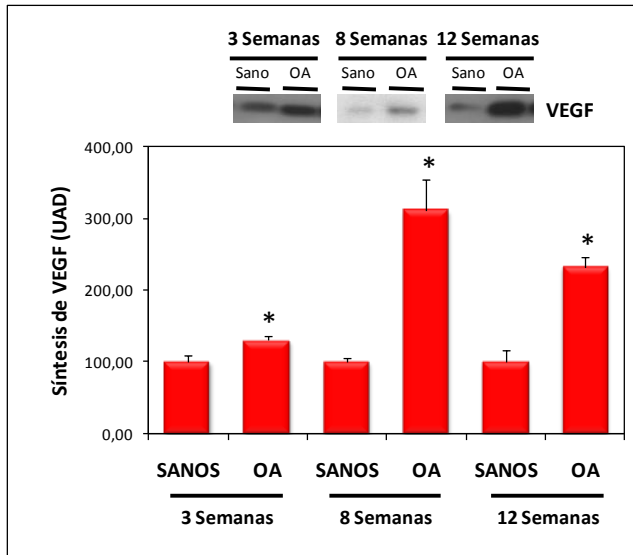


**Figura 17. Efecto de los fármacos sobre la expresión y la síntesis de VEGF inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se preincubaron durante 48 horas con GS y con CS y durante 1 hora con CBX, MXC, DCF e IND, y luego se estimularon durante 24 horas con IL-1 $\beta$ . (A) Expresión génica de VEGF; (B) Síntesis proteica de VEGF; Se muestra un estudio de *Western blot* representativo correspondiente a las señales para VEGF y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de VEGF expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal; #  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ .

Como los resultados obtenidos indicaban un mayor efecto de los SYSADOAS sobre la expresión y la síntesis de los mediadores angiogénicos estudiados, decidimos estudiar el efecto del tratamiento con uno de estos SYSADOAS, el SG, sobre la síntesis de VEGF en un modelo experimental de artrosis en conejo.

## 2.5 Efecto del tratamiento con SG sobre la síntesis de VEGF en un modelo experimental de artrosis en conejo.

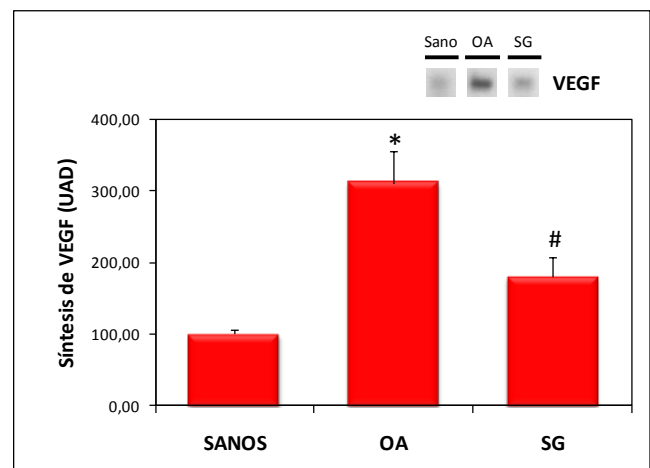
Para estudiar este efecto, empleamos un modelo experimental de artrosis en conejo. Estudiamos varios grupos de conejos albinos machos de raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduros a los que les indujimos artrosis de forma



**Figura 18. Síntesis de VEGF en el cartílago articular de los conejos sanos y OA.** Se muestran un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los conejos correspondiente a las señales para VEGF y los análisis densitométricos de la presencia VEGF expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Conejos SANOS.

A continuación, estudiamos el efecto del tratamiento con SG sobre la síntesis de VEGF<sub>165</sub> en el cartílago. Para ello, a un grupo de conejos se le indujo artrosis por inestabilidad mediante intervención quirúrgica como en el resto de animales, pero a este grupo se le administró 1500 mg/día de SG. El tratamiento comenzó dos semanas antes de la intervención y se mantuvo hasta el final del ensayo. Tras la cirugía, los conejos se dejaron evolucionar durante 8 semanas. Como podemos ver en la figura 19, el tratamiento con SG reduce de forma significativa la síntesis de VEGF<sub>165</sub> cuando se compara el cartílago de los conejos tratados con el de los conejos sin tratar.

experimental mediante una menisectomía parcial medial y la sección del ligamento cruzado anterior en ambas rodillas como se describe en el apartado de métodos. Tras inducir la artrosis, sacrificamos algunos animales y recogimos muestras de cartílago a las 3, 8 y 12 semanas de evolución y medimos la síntesis de VEGF<sub>165</sub> con el fin de conocer en que etapa de la artrosis experimental los conejos sintetizaban más cantidad de este mediador. Como se muestra en la figura 18, cuando la artrosis experimental ha evolucionado durante 8 semanas es cuando los conejos sintetizan más cantidad de VEGF<sub>165</sub>, aunque a las 3 y a las 12 semanas el aumento en la síntesis de VEGF<sub>165</sub> también es significativo.



**Figura 19. Síntesis de VEGF en el cartílago articular de los conejos sanos, OA y SG.** Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los conejos correspondiente a las señales para VEGF y los análisis densitométricos de la presencia VEGF expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Conejos SANOS; #  $p < 0.05$  vs. Conejos OA.

### 3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE OPG/RANK/RANKL EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.

En esta tercera y última parte de la tesis, estudiamos el efecto de la inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> sobre la presencia del sistema OPG / RANK / RANKL, principal modulador del remodelado óseo, en el cartílago artrósico, ya que todavía no se conoce su regulación en este tejido. Para ello estudiaremos el efecto de la inhibición de la PGE<sub>2</sub> sobre estos mediadores en el cartílago de los pacientes con CBX, un inhibidor selectivo de la COX-2. Además estudiaremos la modulación por la PGE<sub>2</sub> de estos mediadores en condrocitos procedentes de pacientes con artrosis. Analizaremos también la síntesis de estos mediadores en el cartílago procedente de un modelo experimental de artrosis en conejo.

#### 3.1 Expresión génica de OPG, RANK y RANKL en pacientes con artrosis.

En primer lugar, medimos la expresión de los mediadores del metabolismo óseo en el cartílago de los pacientes con artrosis pertenecientes al ensayo. No encontramos diferencias en la expresión génica de OPG ni de RANK al comparar el cartílago de los pacientes tratados con CBX con el del grupo CONTROL. Sin embargo, respecto a la expresión génica de RANKL, los pacientes tratados con CBX presentaron una inhibición estadísticamente significativa cuando se compararon al grupo CONTROL ( $0.9 \pm 0.1$  vs.  $1.4 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ), como se muestra en la figura 20.

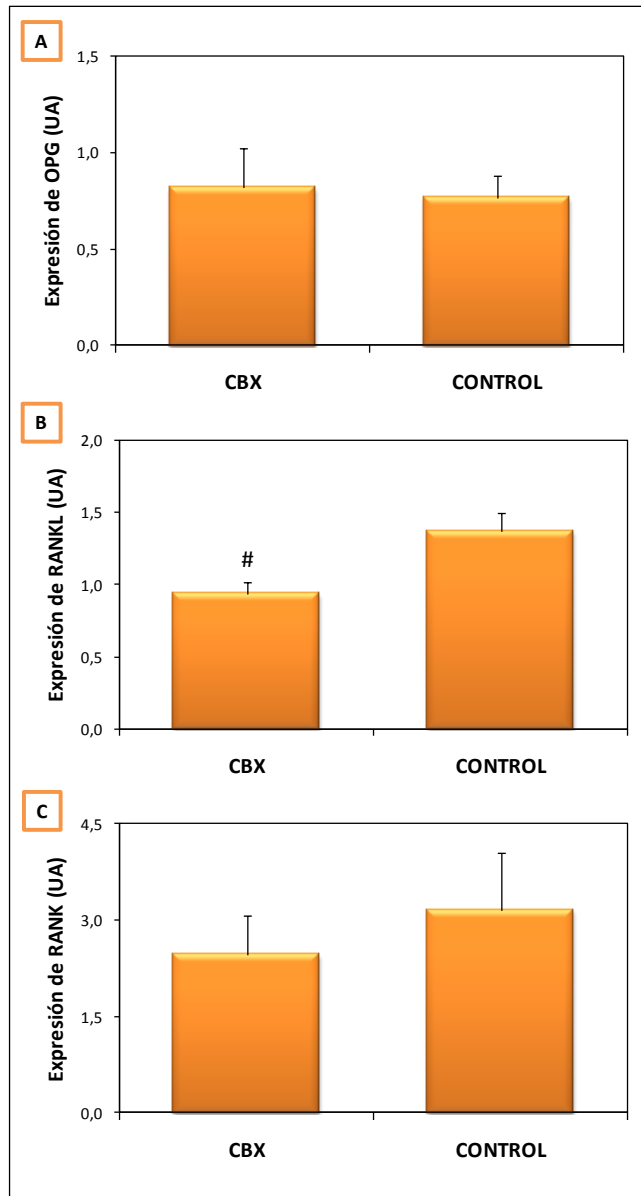
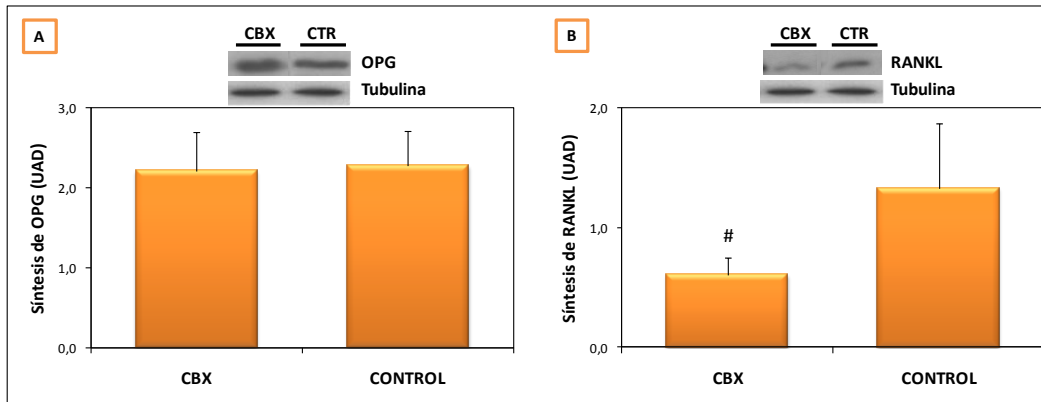


Figura 20. Expresión génica de OPG, RANKL y RANK en el cartílago articular de los pacientes de los grupos CBX y CONTROL. Expresión génica de OPG (A), RANKL (B) y RANK (C) en el cartílago articular de los pacientes medida por PCR a tiempo real. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL.

#### 3.2 Síntesis de OPG y RANKL en pacientes con artrosis.

A continuación analizamos la síntesis proteica de los mediadores estudiados. Tal y como ocurría en los estudios de expresión génica, no encontramos diferencias en la presencia de OPG entre los dos grupos del ensayo. Sin embargo, los pacientes tratados con CBX mostraron una inhibición estadísticamente significativa en la síntesis de RANKL al

compararlos con el grupo CONTROL ( $0.6 \pm 0.2$  vs.  $1.3 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 21). No estudiamos la síntesis proteica de RANK porque en los estudios de expresión génica no encontramos diferencias entre los grupos incluidos en este trabajo.



**Figura 21. Síntesis OPG y RANKL en el cartilago articular de los pacientes de los grupos CBX y CONTROL.** Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartilago articular de los pacientes correspondiente a las señales para OPG (A), RANKL (B) y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de OPG y RANKL expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL.

### 3.3 Ratio OPG / RANKL.

Como el tratamiento con CBX modifica tanto la expresión como la síntesis de RANKL, calculamos el ratio OPG/RANKL en el cartilago de los pacientes con artrosis, ya que esta relación se conoce como un importante factor determinante en el metabolismo óseo [200, 201]. Del equilibrio resultante entre la expresión de OPG y RANKL depende la regulación de la diferenciación y la activación de los osteoclastos. Un aumento en la expresión de OPG o una disminución en la de RANKL, como ocurre en el caso de los pacientes tratados con CBX, supone un incremento en el ratio OPG/RANKL, lo que significa que se inhibe la osteoclastogénesis, es decir, se inhibe la resorción ósea. Por esto, el aumento en el ratio OPG/RANKL puede ser considerado como una señal anti-resortiva. En el cartilago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico, los pacientes tratados con CBX mostraron un aumento en el ratio OPG/RANKL que fue estadísticamente significativo en comparación con los pacientes CONTROL, tanto al estudiar la expresión génica ( $0.9 \pm 0.3$  vs.  $0.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ), como la síntesis proteica ( $5.0 \pm 1.0$  vs.  $2.1 \pm 0.7$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 22).

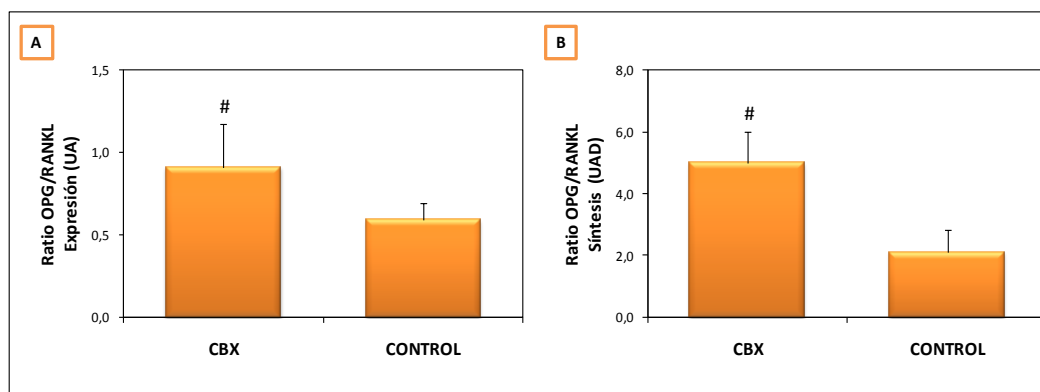


Figura 22. Ratio OPG/RANKL en el cartilago articular de los pacientes de los grupos CBX y CONTROL. (A) Expresión génica y (B) Síntesis proteica. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. # $p < 0.05$  vs. pacientes CONTROL.

### 3.4 Localización de OPG y de RANKL en el cartilago de los pacientes con artrosis.

Nuestro siguiente objetivo fue localizar tanto OPG como RANKL en el cartilago de los pacientes con artrosis. La localización de OPG y de RANKL ya se había estudiado previamente en pacientes sanos en comparación con pacientes con artrosis leve (índice mankin 2-3) [150]. En ese estudio los autores localizaban tanto OPG como RANKL en la zona superficial del cartilago y en algunas células de la zona media [150]. En nuestro trabajo localizamos las dos proteínas en el cartilago de los pacientes incluidos en el ensayo, que tenían una artrosis avanzada con un índice mankin de entre 9 y 14 (Media:  $11.4 \pm 0.4$ ). Realizamos las inmunohistoquímicas de OPG y de RANKL en el cartilago articular de pacientes pertenecientes a los diferentes grupos de tratamientos incluidos en el ensayo de acuerdo a lo descrito en el apartado de métodos.

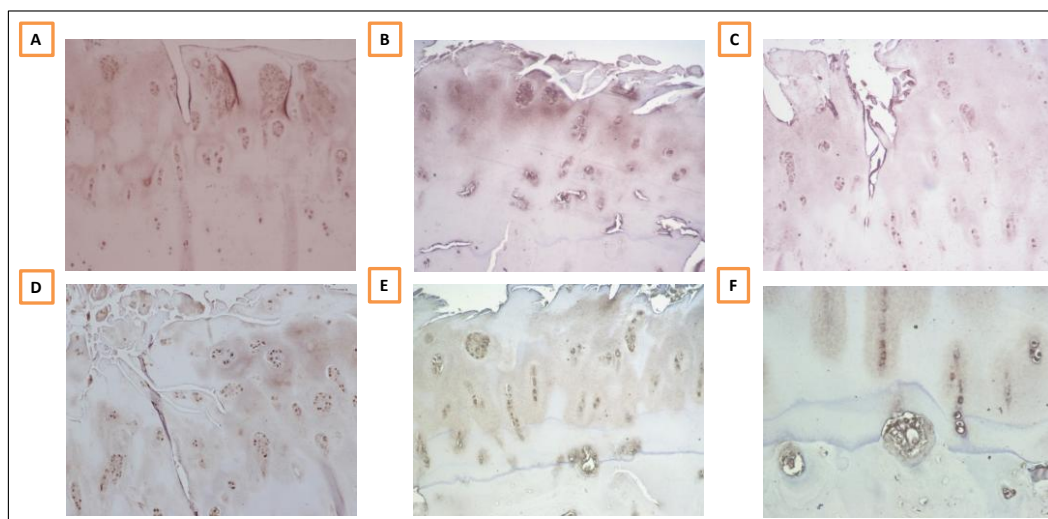


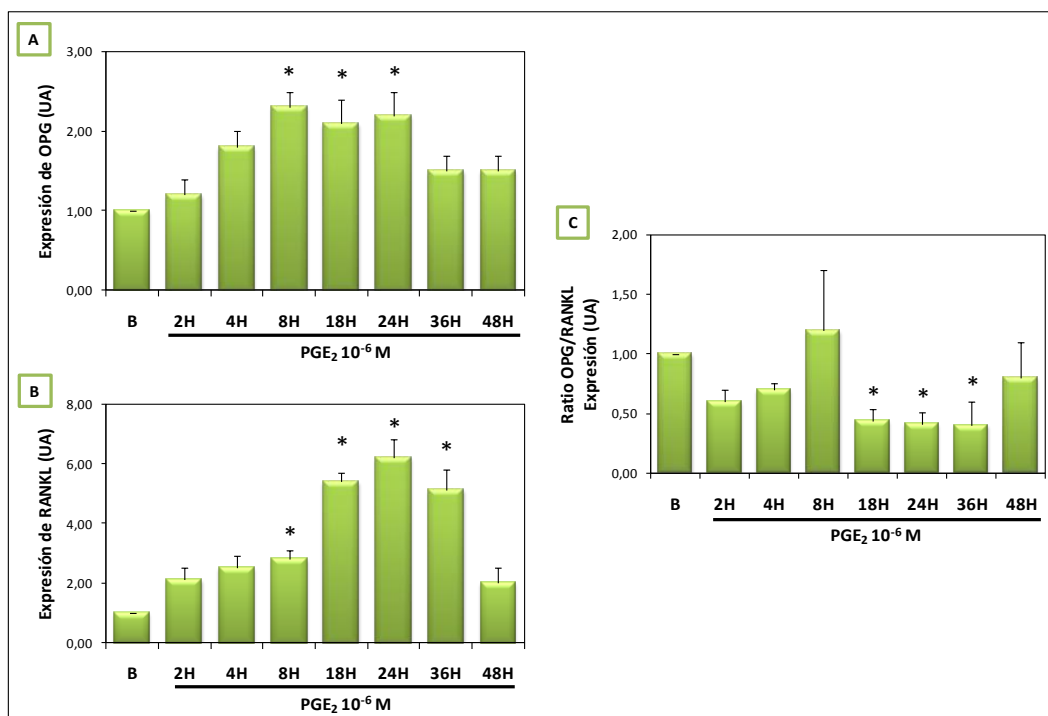
Figura 23. Localización de OPG (A, B, C) y RANKL (D, E, F) en el cartilago articular de los pacientes. Se muestran fotografías representativas de pacientes del grupo CONTROL. No hubo diferencias en la localización de estas proteínas entre los diferentes grupos incluidos en el ensayo. La tinción se realizó mediante la técnica de la peroxidasa como se describe en el apartado de métodos. Aumentos: A-E: 100x; F: 200x.

La tinción para OPG fue positiva en los condrocitos de todas las zonas del cartilago, incluyendo la zona de proliferación de condrocitos, aunque también observamos una clara señal extracelular (Figura 23). Respecto a RANKL, la tinción fue positiva en la mayoría de los condrocitos de todas las zonas del cartilago, con una señal intensa en las clonas de condrocitos; También encontramos RANKL en el tejido pericelular, especialmente en las zonas más profundas; Además, obtuvimos una tinción positiva para RANKL tanto en los vasos sanguíneos que atraviesan el frente de calcificación como en los condrocitos embebidos en este frente, y también en algunas células del cartilago calcificado (Figura 23). La localización de ambas proteínas fue similar entre los diferentes grupos de pacientes, mientras que las diferencias en la cantidad de proteína se correlacionan con los estudios de *Western blot*.

Como el tratamiento con CBX modifica el ratio OPG/RANKL en el cartilago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico, quisimos comprobar si esta modificación se produce por los diferentes efectos que tiene el tratamiento con CBX además de inhibir la síntesis de PGE<sub>2</sub>, o si solamente la PGE<sub>2</sub> puede modular directamente estos mediadores. Para ello, realizamos una serie de experimentos *in vitro* en condrocitos humanos procedentes de pacientes con artrosis avanzada de rodilla. Estimulamos a los condrocitos con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y medimos después la expresión y la síntesis de OPG y RANKL.

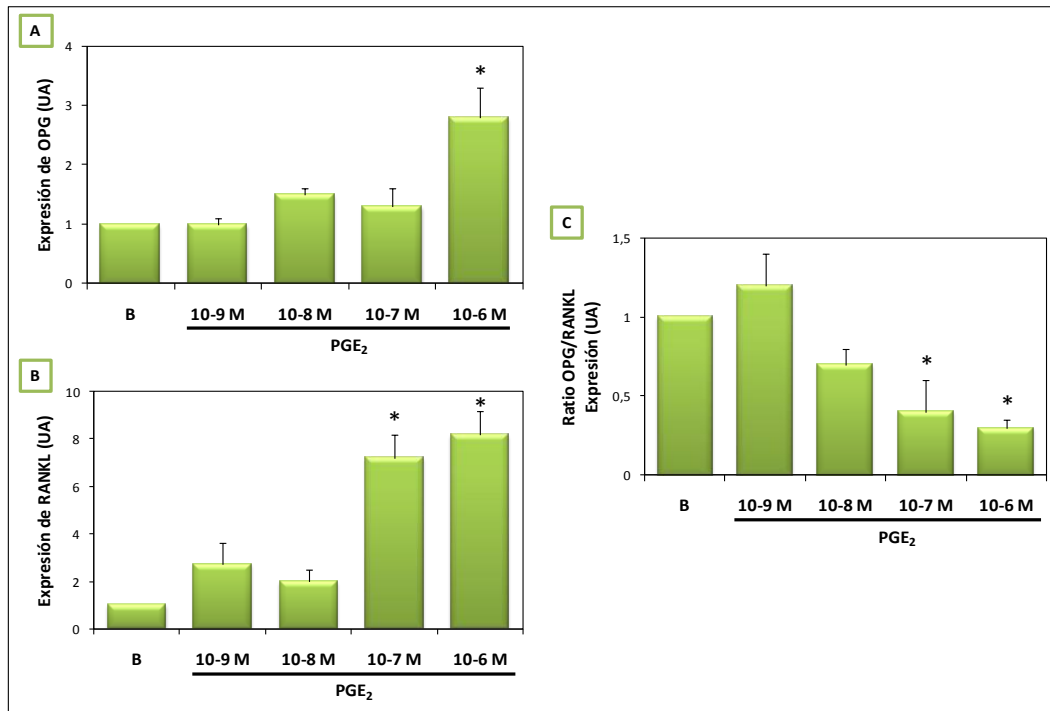
### **3.5 Efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre la expresión y la síntesis de OPG, RANK y RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.**

Mediante la técnica de PCR a tiempo real estudiamos el efecto tiempo dependiente de la estimulación con PGE<sub>2</sub> sobre la expresión génica de OPG, RANKL y RANK en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. Estimulamos las células con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M), durante diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 18, 24, 36 y 48 horas). Como se muestra en la figura 24, la PGE<sub>2</sub> a esta concentración induce un incremento en la expresión génica tanto de OPG como de RANKL de forma dependiente del tiempo de incubación. El aumento en la expresión génica de OPG fue estadísticamente significativo desde las 8 horas de incubación hasta las 24 horas en comparación con células no estimuladas. La expresión génica de RANKL también se incrementó de forma estadísticamente significativa desde las 8 hasta las 36 horas de incubación en comparación con la expresión de las células en estado basal, aunque este incremento en la expresión de RANKL fue siempre superior al observado para la expresión de OPG. De esta forma, la relación OPG / RANKL disminuyó de forma tiempo dependiente, siendo mínima a las 24 horas de incubación. La expresión de RANK fue difícil de medir mediante PCR a tiempo real, ya que los valores de Ct en las muestra de los condrocitos artrósicos humanos en cultivo fueron muy altos y siempre mayores que los observados para OPG y RANKL. Usando condiciones similares en la RT y en la PCR a tiempo real, los valores de Ct para OPG y RANKL oscilan entre 19 y 25 para OPG y entre 29 y 34 para RANKL, mientras que los valores de Ct para RANK siempre eran superiores a 37 cuando se detectaban.



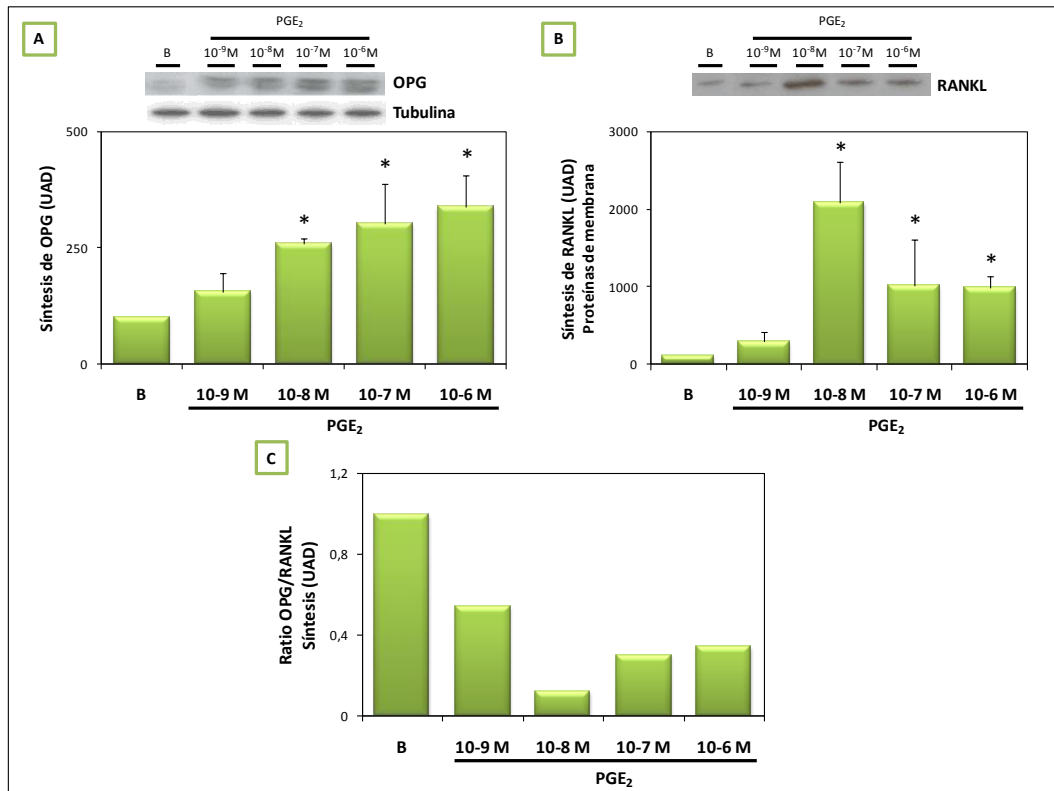
**Figura 24. Efecto tiempo dependiente de la PGE<sub>2</sub> sobre la expresión génica de OPG y RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante diferentes periodos de incubación (0, 2, 4, 8, 18, 24 y 36 horas) con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M). (A) Expresión génica de OPG; (B) Expresión génica de RANKL; (C) Ratio OPG/RANKL (Expresión génica). Datos expresados como media ± EEM. \*p<0.05 vs. Basal.

A continuación estudiamos la expresión génica y la síntesis proteica de OPG y RANKL en los condrocitos humanos estimulados con diferentes dosis de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M – 10<sup>-6</sup> M), mediante las técnicas de PCR a tiempo real y Western blot respectivamente. Únicamente la dosis de 10<sup>-6</sup> M indujo un incremento estadísticamente significativo en la expresión génica de OPG al comparar las células estimuladas con células en estado basal, mientras que la expresión génica de RANKL aumentó a las dosis de 10<sup>-6</sup> M y 10<sup>-7</sup> M. De forma similar a lo ocurrido al medir la expresión génica de estos dos mediadores en las curvas de tiempo, la expresión de RANKL fue siempre superior a la OPG para cada concentración de PGE<sub>2</sub>. Así, el ratio OPG / RANKL disminuyó significativamente a las dosis de 10<sup>-6</sup> M y 10<sup>-7</sup> M (Figura 25).

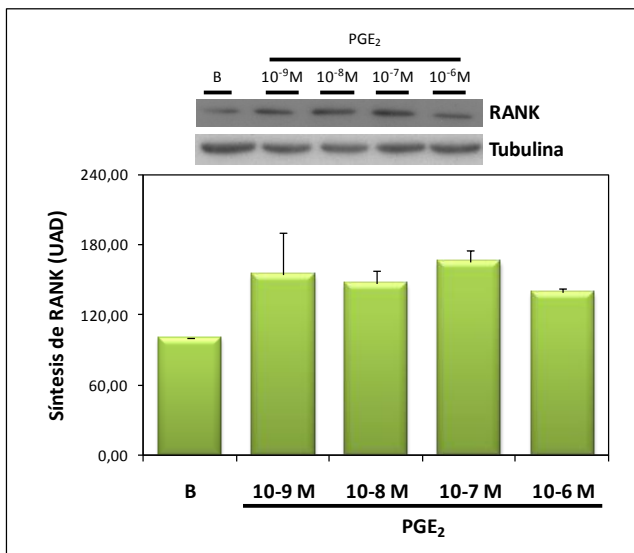


Después, estudiamos la presencia de estos mediadores en los condrocitos en cultivo mediante *Western blot*. Para estudiar la síntesis de OPG, extrajimos extracto de proteína total de los condrocitos en cultivo. Como se puede observar en la figura 26, la producción de OPG se incrementa significativamente a las dosis de 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> M. Al estudiar la síntesis de RANKL en los extractos de proteína celular no observamos ningún efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre su presencia. A continuación estudiamos si la PGE<sub>2</sub> podría modificar el RANKL anclado en la membrana celular. Para ello, repetimos los experimentos y extrajimos las proteínas de las membranas celulares de los condrocitos en cultivo según lo descrito en el apartado de métodos. En los extractos de proteínas de membrana, la PGE<sub>2</sub> aumentó de forma estadísticamente significativa la presencia de RANKL a las mismas dosis a las que aumentó la presencia de OPG. El aumento en la presencia de RANKL, como ocurrió al estudiar la expresión génica de estos mediadores, fue siempre superior al observado para OPG (Figura 26). Por lo tanto, el ratio OPG (Proteína total) / RANKL (Proteína anclada en membrana) disminuyó.





**Figura 26. Efecto dosis dependiente de la PGE<sub>2</sub> sobre la síntesis proteica de OPG y RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante 24 horas a diferentes dosis de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M – 10<sup>-6</sup> M). (A) Síntesis proteica de OPG; (B) Síntesis proteica de RANKL; (C) Ratio OPG/RANKL (Síntesis proteica). Se muestra un estudio de Western blot representativo en condrocitos artrósicos humanos en cultivo correspondiente a las señales para OPG y  $\alpha$ -tubulina y para RANKL y los análisis densitométricos de la presencia de OPG y RANKL expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina cuando fue posible. Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Basal.



**Figura 27. Efecto dosis dependiente de la PGE<sub>2</sub> sobre la síntesis proteica de OPG y RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante 24 horas a diferentes dosis de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M – 10<sup>-6</sup> M). Se muestra un estudio de Western blot representativo en condrocitos artrósicos humanos en cultivo correspondiente a las señales para RANK y  $\alpha$ -tubulina y los análisis densitométricos de la presencia de RANK expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de  $\alpha$ -tubulina. Datos expresados como media  $\pm$  EEM.

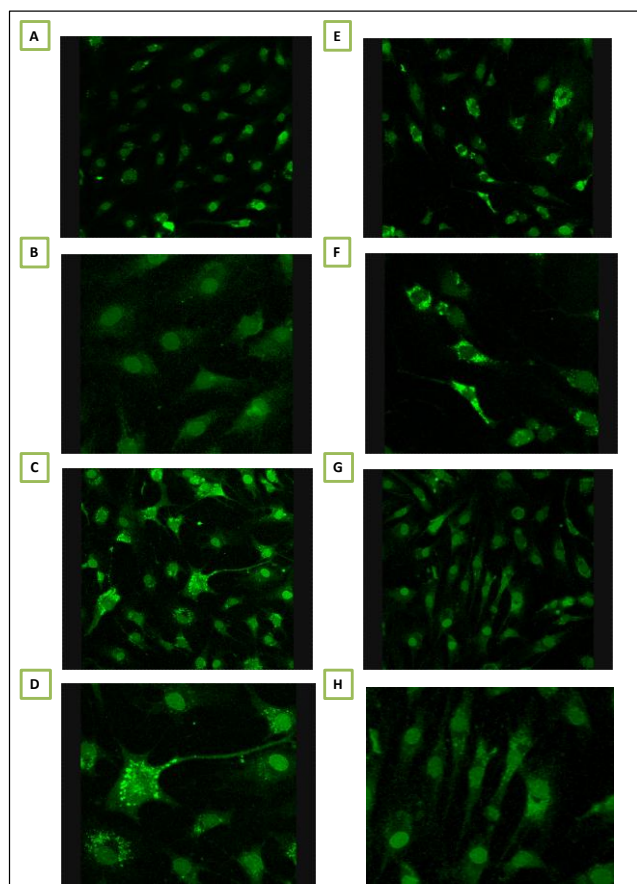
Con el propósito de confirmar la síntesis de RANK en los condrocitos artrósicos humanos en cultivo, estudiamos la presencia de esta proteína en los extractos de proteína total. Confirmamos, mediante la técnica del *Western blot*, que los condrocitos sintetizan RANK. Sin embargo, la presencia de PGE<sub>2</sub> no modificó la síntesis de esta proteína a ninguna de las dosis empleadas (FIGURA 27). En los extractos de proteína de membrana observamos una señal muy débil para RANK, que tampoco fue modificada por la presencia de PGE<sub>2</sub>.

### 3.6 Inmunocitoquímica de RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.

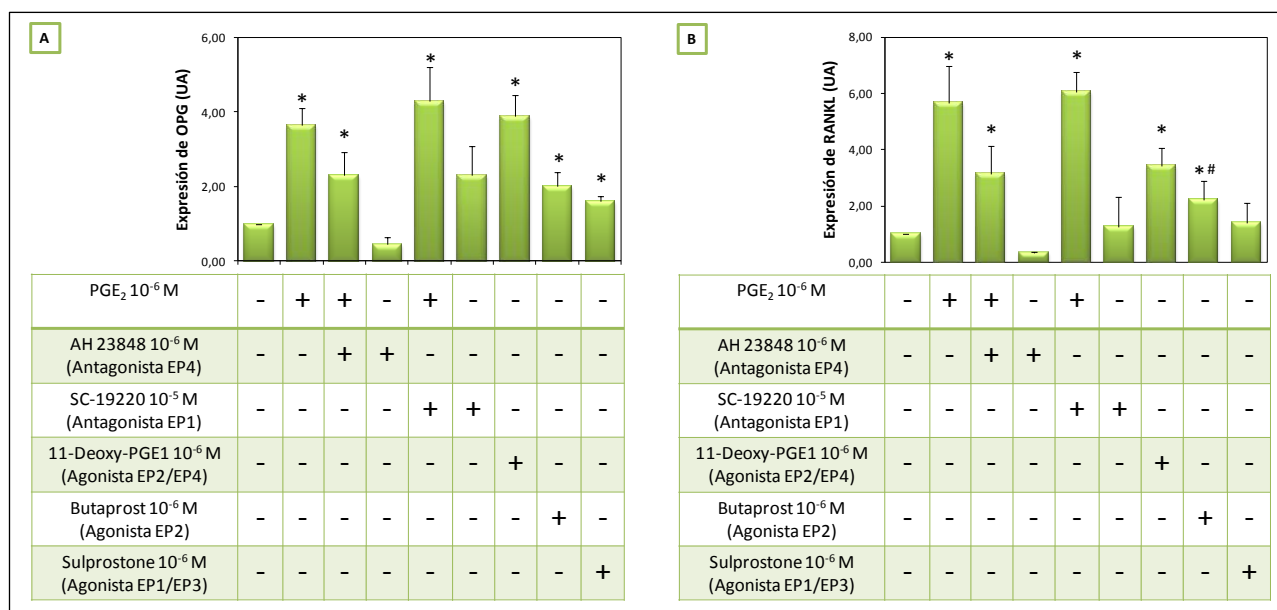
Con el fin de evaluar si el aumento de la presencia de RANKL en los extractos de proteína de membrana de los condrocitos artrósicos humanos en cultivo fue debido a un aumento en el anclaje de RANKL a la membrana de estas células, analizamos la localización de esta proteína empleando las técnicas de inmuno-tinción y análisis de las imágenes mediante microscopía confocal, como explicamos en el apartado de métodos. En los condrocitos no estimulados, encontramos una escasa señal de RANKL localizada principalmente en el citoplasma celular. La presencia de PGE<sub>2</sub> induce una fuerte señal de RANKL que se localiza principalmente en la membrana de los condrocitos (Figura 28).

### 3.7 Efecto de diferentes agonistas y/o antagonistas de los distintos receptores EPs sobre la expresión y la síntesis de OPG y de RANKL.

Nuestro siguiente objetivo fue conocer a través de cual o de cuales de los receptores celulares la PGE<sub>2</sub> ejerce mayoritariamente su acción sobre los mediadores que estudiamos en este tercer apartado de la tesis. Con este motivo utilizamos en los condrocitos artrósicos humanos en cultivo agonistas específicos de diferentes receptores EPs y antagonistas de estos receptores incubados con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y analizamos la expresión génica de OPG y de RANKL mediante PCR a tiempo real y la síntesis proteica de estos dos mediadores mediante Western blot. Respecto a la expresión génica, como se muestra en la figura 29, la co-incubación de los condrocitos con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y con AH23848 (10<sup>-6</sup> M), un antagonista del receptor EP4, no inhibió de forma significativa ni la expresión de OPG ni la de RANKL. Tampoco tuvo ningún efecto sobre la expresión de OPG y de RANKL la co-incubación de la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) con SC-19220 (10<sup>-5</sup> M), un antagonista del receptor EP1. Cuando se incuban solos, estos antagonistas no tienen efecto alguno sobre la expresión de los mediadores. Tanto el 11-deoxy-PGE1 (10<sup>-6</sup> M), un agonista específico de los receptores EP2/EP4, como el Butaprost (10<sup>-6</sup> M), un agonista del receptor EP2, inducen la expresión de forma estadísticamente significativa de OPG y de RANKL, aunque el Butaprost fue menos potente que el 11-deoxy-PGE1 en el aumento en la expresión de ambos mediadores. La incubación con Sulprostone (10<sup>-6</sup> M), un agonista específico de los receptores EP1/EP3 no tuvo ningún efecto significativo en la expresión génica de RANKL, mientras que aumentó la expresión de génica de OPG (Figura 29).



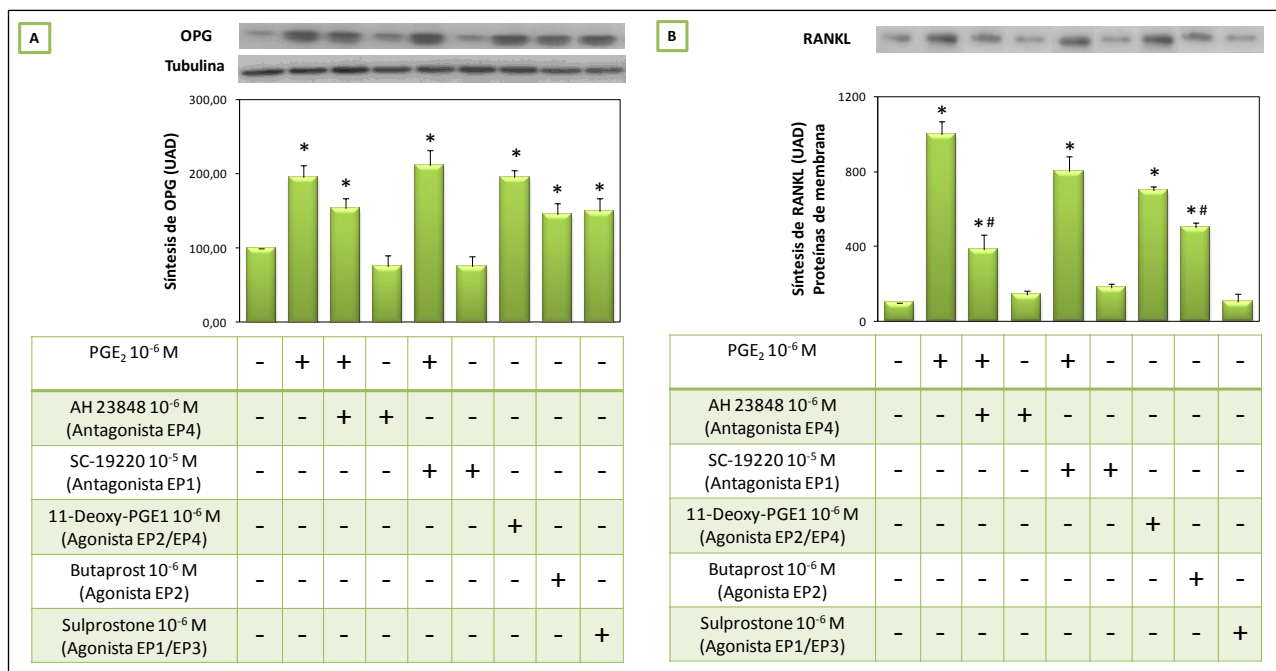
**Figura 28. Efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre la translocación de RANKL a la membrana celular en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.** Las células se estimularon durante 24 horas con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) o con agonistas específicos de los receptores celulares de la PGE<sub>2</sub>, y la distribución de RANKL se determinó por inmunofluorescencia como se describe en el apartado de métodos. Células sin estimular (A, B). Células tratadas con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) (C, D). Células tratadas con 11-deoxy-PGE2 (Agonista EP2/EP4) (10<sup>-6</sup> M) (E, F). Células tratadas con Sulprostone (Agonista EP1/EP3) (10<sup>-6</sup> M) (G, H).



**Figura 29. Efecto de diferentes agonistas y antagonistas de los distintos receptores EPs sobre la expresión génica de OPG y de RANKL.** Las células se incubaron durante 24 horas con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y/o con AH23848 (10<sup>-6</sup> M), SC-19220 (10<sup>-5</sup> M), 11-Deoxy-PGE1 (10<sup>-6</sup> M), Butaprost (10<sup>-6</sup> M) y Sulprostone (10<sup>-6</sup> M). (A) Expresión génica de OPG; (B) Expresión génica de RANKL. Datos expresados como media ± EEM. \*p<0.05 vs. Basal; # p<0.05 vs. solo PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M).

Respecto a la síntesis proteica, la co-incubación de los condrocitos con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y los dos antagonistas utilizados en este experimento no tuvo ningún efecto para la OPG, sin embargo, la co-incubación de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) con AH23848 (10<sup>-6</sup> M), el antagonista del receptor EP4, inhibió significativamente la presencia de RANKL en la membrana de los condrocitos. La co-incubación con el antagonista del receptor EP1 no inhibió la presencia de RANKL. Estos antagonistas cuando se incubaron solos no tuvieron ningún efecto ni en la síntesis de RANKL ni en la de OPG. Tanto el agonista de EP2 como el de EP2/EP4 indujeron la síntesis de OPG y de RANKL; El agonista de EP1/EP3 solo indujo la síntesis de OPG (Figura 30).

También estudiamos el efecto de estos agonistas en la localización por inmuno-tinción de RANKL. La incubación de los condrocitos con el 11-Deoxy-PGE1 (10<sup>-6</sup> M), agonista de EP2/EP4, induce un patrón similar de localización de RANKL al observado con la incubación de los condrocitos con la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) (Figura 28E, 28F). Observamos resultados similares incubando los condrocitos con Butaprost (10<sup>-6</sup> M), agonista de EP2. En contraste, cuando incubamos las células con Sulprostone (10<sup>-6</sup> M), el agonista de EP1/EP3, no observamos RANKL en la membrana de los condrocitos (Figura 28G, 28H).



**Figura 30. Efecto de diferentes agonistas y antagonistas de los distintos receptores EPs sobre la síntesis de OPG y de RANKL.** Las células se incubaron durante 24 horas con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) y/o con AH23848 (10<sup>-6</sup> M), SC-19220 (10<sup>-5</sup> M), 11-Deoxy-PGE1 (10<sup>-6</sup> M), Butaprost (10<sup>-6</sup> M) y Sulprostone (10<sup>-6</sup> M). (A) Síntesis de OPG; (B) Síntesis de RANKL. Se muestra un estudio de Western blot representativo en condrocitos artrósicos humanos en cultivo correspondiente a las señales para OPG y α-tubulina (A) y para RANKL (B) y los análisis densitométricos de la presencia de OPG (A) y de RANKL (B) expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) con respecto a la de α-tubulina cuando fue posible. Datos expresados como media ± EEM. \*p<0.05 vs. Basal; # p<0.05 vs. solo PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M).

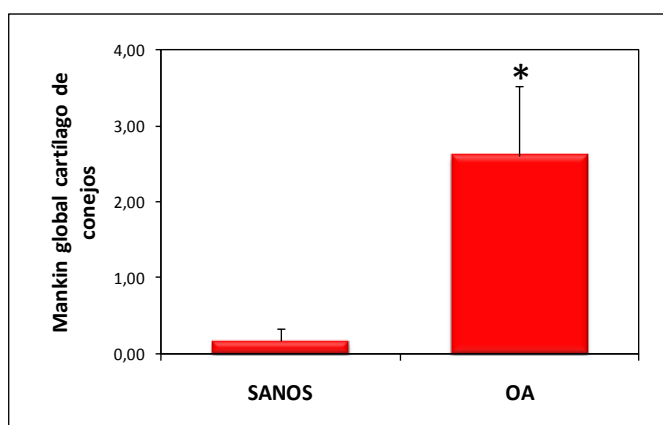
### 3.8 Estudios en animales.

Para concluir, quisimos estudiar si los resultados obtenidos en esta parte de la tesis se podían reproducir en el modelo de artrosis experimental en conejo que ya habíamos utilizado para estudiar mediadores angiogénicos. En este ensayo, incluimos 12 conejos albinos machos de la raza Nueva Zelanda. A seis de los conejos les indujimos artrosis mediante intervención quirúrgica como se describe en el apartado de métodos. Los conejos se dejaron evolucionar durante 12 semanas, tras las cuales sacrificamos los conejos y recogimos muestras las de cartílago.

#### 3.8.1 Histopatología del cartílago articular de los conejos.

Para la valoración histopatológica microscópica del cartílago articular de los conejos se evaluaron las muestras mediante la escala de Mankin en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Las alteraciones histopatológicas que se encontraron se describen a continuación:

Observamos que las rodillas con artrosis mostraron un índice global significativamente más elevado que



**Figura 31. Histopatología del cartílago articular en los conejos de los grupos sanos y OA.** Las gráficas de barras muestran la valoración del daño del cartílago articular de acuerdo a la escala de Mankin. Los resultados se expresan como media ± EEM, n = 10 conejos por grupo.

las rodillas sanas. La mayoría de las rodillas con artrosis presentaban alteraciones en la estructura, en la celularidad y en la tinción de la matriz, pero la línea ondulante basófila o *tidemark* apareció normal en todas las muestras, sin apreciarse invasión vascular. Las principales alteraciones estructurales de las rodillas artrósicas consistieron en irregularidades focales, con zonas de desflecamiento, hendiduras y/o úlceras que alcanzaban la zona de transición. También mostraron una disminución en la tinción de la matriz de leve a moderada. Con respecto a los cambios de la celularidad, las rodillas artrósicas mostraron alteraciones de leves a moderadas, con presencia ocasional de clones. En la figura 31 se representa la puntuación global obtenida en la valoración histopatológica del cartílago articular en los diferentes grupos estudiados según la escala de Mankin.

### 3.8.2 Síntesis de OPG y RANKL en el cartílago articular de los conejos.

Mediante estudios de Western blot estudiamos la síntesis de OPG y de RANKL en el cartílago articular de conejos sanos, y la comparamos con la síntesis de los mediadores en el cartílago de conejos con artrosis. Como se muestra en la figura 32, no se encontraron diferencias en la presencia de OPG entre los conejos sanos y los OA. Sin embargo, los conejos OA mostraron un aumento estadísticamente significativo en la síntesis de RANKL al compararlos con el grupo de conejos sanos ( $100.0 \pm 13.1$  vs.  $1134.1 \pm 172.1$ ,  $p < 0.05$ ). Así, el ratio OPG/RANKL disminuyó de forma estadísticamente significativa al comparar el cartílago de los conejos sanos con el cartílago de los conejos OA (Figura 32).

Según estos datos, el modelo experimental de artrosis en conejo sirve para estudiar el sistema OPG/RANKL en la artrosis, por lo que continuaremos investigando en este modelo el efecto sobre la expresión génica y la síntesis proteica de OPG y RANKL de los tratamientos anti-artrósicos que hemos usado en esta tesis.

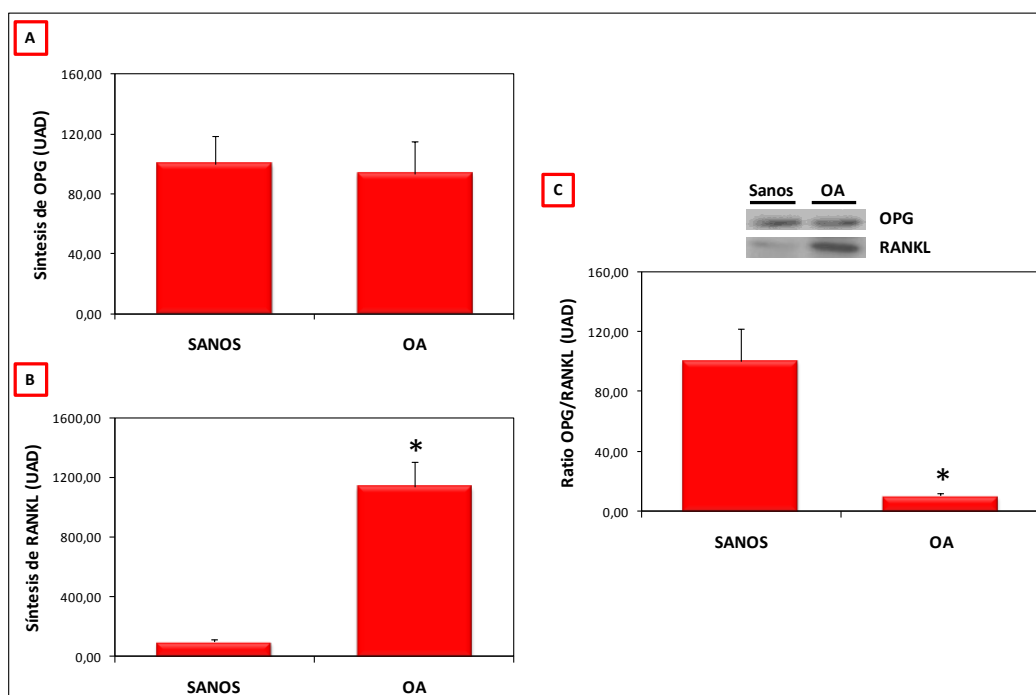


Figura 32. Síntesis OPG (A) y RANKL (B) y ratio OPG/RANKL (C) en el cartílago articular de los conejos sanos y OA. Se muestra un estudio de Western blot representativo en el cartílago articular de los conejos correspondiente a las señales para OPG y para RANKL y los análisis densitométricos de la presencia de OPG y RANKL expresados en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD). Datos expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs. Conejos SANOS.

## **V. DISCUSIÓN**

## 1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.

La homeostasis del cartílago articular es el resultado de una compleja interacción entre mediadores anabólicos y catabólicos y mediadores anti y proinflamatorios. Los condrocitos, único tipo celular presente en el cartílago, representan sólo el 10% del volumen del tejido, pero son unos versátiles reguladores del equilibrio del cartílago. Los condrocitos son muy sensibles a muchos tipos de estímulos, ya sean mecánicos, bioquímicos o de otro tipo. La homeostasis del cartílago puede alterarse por un aumento en la concentración de factores catabólicos, procedentes del propio cartílago o de los tejidos vecinos, tales como citoquinas proinflamatorias, que pueden dar como resultado la destrucción del cartílago y la artrosis [202].

La PGE<sub>2</sub>, el eicosanoide más abundante de las articulaciones artrósicas [49], modula varios de los principales procesos implicados en la destrucción gradual del tejido en la artrosis, como son la activación de proteasas, la síntesis de proteínas de matriz, la proliferación y la apoptosis celular, la neoangiogénesis, la síntesis de mediadores estructurales, etc. [28, 52, 54-56] y ha sido durante décadas diana en muchas de las terapias contra la artrosis. En el líquido y en la membrana sinovial de pacientes con artrosis se han detectado altas concentraciones de PGE<sub>2</sub> [50, 51], de hecho, la membrana sinovial es la principal fuente de producción de PGE<sub>2</sub> durante la artrosis [51], pero la PGE<sub>2</sub> puede ser sintetizada por condrocitos, sinoviocitos y macrófagos [52]. En el cartílago, la PGE<sub>2</sub> puede ejercer efectos pro ó anticatabólicos [28]. La PGE<sub>2</sub> inhibe la degradación tanto de los proteoglicanos como de las proteínas de la matriz [57, 58], mientras que la inhibición de la PGE<sub>2</sub> previene el daño del cartílago inducido por citoquinas [64] e incrementa la síntesis de proteoglicanos en el cartílago artrósico [65, 66].

Los AINES clásicos y los inhibidores selectivos de la COX-2 se emplean habitualmente en el tratamiento de la artrosis. A pesar de que estos fármacos se emplean durante largos periodos de tiempo, todavía no se conoce con exactitud sus efectos directos sobre los condrocitos y el metabolismo del cartílago. Estos efectos se basan principalmente en la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa, disminuyendo así la síntesis de la PGE<sub>2</sub>. Además de participar en la aparición del dolor y en la inflamación observada en la artrosis, la PGE<sub>2</sub> juega un papel importante en la degeneración del cartílago asociada a esta enfermedad [203]. Existe un creciente interés en conocer los efectos de los AINES en el cartílago, pero estos efectos no pueden ser estudiados fácilmente ya que los cambios en el cartílago durante la artrosis se producen de una forma bastante lenta. La mayor parte de la información sobre como actúan los AINES proviene de estudios a corto plazo con células o explantes. Aunque muchos de los pacientes tratados con AINES los han tomado durante varios años, existen pocos estudios que evalúen el efecto de los AINES a largo plazo.

En la primera parte de la tesis, hemos demostrado que el tratamiento con AINES inhibe la expresión génica y la síntesis proteica tanto de la COX-2 como de la mPGES-1 en el cartílago de pacientes con artrosis avanzada de rodilla. Estas dos enzimas son clave en la vía de la síntesis de la PGE<sub>2</sub>. A si mismo, hemos demostrado la inhibición de la expresión y de la síntesis de estas dos enzimas en condrocitos artrósicos humanos en cultivo, estimulados con

IL-1 $\beta$  y tratados después con DCF y CBX, los dos AINES incluidos en este estudio. Estos resultados concuerdan con otros publicados previamente en relación a la inhibición de la COX-2 en presencia de diferentes AINES en células leucémicas, en células de carcinoma de pulmón y en sinoviocitos [204, 205]; Además, un inhibidor selectivo de la COX-2 redujo su presencia en explantes de cartílago en un modelo experimental de artrosis [206].

Los AINES empleados en este estudio ejercen una inhibición similar en la presencia de la COX-2 y de la mPGES-1 en el cartílago artrósico humano, según nuestros datos. Durante la artrosis la concentración de estas dos enzimas es elevada en el cartílago [28, 203]. La producción de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial de las rodillas de los pacientes incluidos en el mismo ensayo clínico se inhibió de forma similar tras el tratamiento con ACF o con CBX. La concentración de la PGE<sub>2</sub> se redujo en torno a un 60% debido a la acción de los AINES en la membrana sinovial y muy probablemente en el cartílago articular. Sin embargo, tanto nuestros datos como los de otros grupos demuestran que *in vitro*, la mayor parte de los AINES inhiben dramáticamente la liberación celular de PGE<sub>2</sub> [207-210]. Las divergencias que se obtienen, tanto en nuestros resultados como en los resultados de otros estudios, sobre la inhibición de la PGE<sub>2</sub> por AINES entre estudios *in vitro* e *in vivo*, pueden ser debidas, al menos en parte, a la multiplicidad de factores que diferencian ambos tipos de experiencias, como los aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos o la participación de otros sistemas que aumentan o disminuyen los efectos, fisiológicamente o por la acción de los mismos fármacos en estudio [211]. Hay que tener en cuenta la biodisponibilidad del fármaco. Las concentraciones de los AINES que empleamos en nuestros experimentos *in vitro* es la equivalente a la que se encuentra en el plasma de los pacientes tras ser tratados con una dosis terapéutica; Evidentemente, la cantidad de fármaco que penetra en las células diana es mayor en los experimentos *in vitro*, ya que añadimos los AINES directamente sobre estas células. Además, también hay que diferenciar entre los efectos que puede provocar un AINE sobre un estado agudo, como en el caso de los experimentos *in vitro*, o sobre un estado crónico, como en el caso de los pacientes, que han consumido el fármaco durante tres meses y, como demostramos en esta tesis, los AINES no sólo actúan como antiinflamatorios por su inhibición de síntesis de PGE<sub>2</sub>, sino que también de manera directa o indirecta modifican otros mediadores de la inflamación.

El mecanismo por el que se inhiben la COX-2 y la mPGES-1 cuando se disminuye la concentración de PGE<sub>2</sub> en el cartílago todavía no se conoce con exactitud. La misma PGE<sub>2</sub> podría regular su propia síntesis, al menos parcialmente, ya que se ha demostrado que estabiliza el ARNm de la COX-2 y promueve su traducción en células sinoviales [212]. Por lo tanto, en presencia de concentraciones bajas de PGE<sub>2</sub>, el ARNm de la COX-2 es menos estable. En este contexto, nuestro grupo demostró que la presencia de PGE<sub>2</sub> incrementa la síntesis de COX-2 en fibroblastos sinoviales en cultivo estimulados con IL-1 $\beta$  [207]. La mPGES-1 se encuentra incrementada tanto en la membrana sinovial como en el cartílago de la articulación artrósica [213, 214], así como en sinoviocitos y en condrocitos estimulados con diferentes citoquinas [44, 215]. Esta enzima está implicada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria así como en otros efectos producidos por PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> también podría regular su síntesis mediante la mPGES-1 ya que se ha observado que la adición de PGE<sub>2</sub> exógena es capaz de revertir la disminución en la expresión de la mPGES-1 producida por el uso de varios inhibidores selectivos de la COX-2 en fibroblastos sinoviales [216].



En España, es frecuente la elección de ACF en el tratamiento de artrosis avanzada de rodilla para pacientes en los que ya no son efectivos ni el paracetamol ni el ibuprofeno [217]. En la actualidad no se permite el uso de algunos inhibidores selectivos de la COX-1 en el tratamiento contra la artrosis de rodilla. Por este motivo, escogimos en el ensayo clínico el ACF como comparador con un inhibidor selectivo de la COX-2. En humanos, el ACF se metaboliza rápidamente en *4'-hidroxiaceclofenaco*, en DCF y en *4'-hidroxiciclofenaco* [218]. Con respecto a la síntesis de PGE<sub>2</sub> se ha demostrado que el ACF y el *4'-hidroxiaceclofenaco* no tienen ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de la COX-2. De hecho, el ACF solo es capaz de suprimir la producción de PGE<sub>2</sub> tras su conversión en DCF y *4'-hidroxiciclofenaco* [219, 220].

La PGE<sub>2</sub> produce diferentes efectos sobre las células de forma que puede tener propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias. Esta variedad en los efectos que provoca la PGE<sub>2</sub> podría explicarse en parte por la existencia de cuatro receptores diferentes para este mediador, denominados EP1, EP2, EP3 y EP4 [221]. Estos receptores están acoplados a diferentes rutas de señalización intracelular, lo que podría ser la causa del amplio espectro de efectos atribuidos a la PGE<sub>2</sub>. Además, parece que la PGE<sub>2</sub> podría tener diferentes efectos dependiendo del contexto de la activación y de la población celular. Por ejemplo, se ha descrito que la PGE<sub>2</sub> a través del receptor EP4 podría presentar efectos antiinflamatorios al suprimir la producción de quimioquinas en macrófagos humanos [222] y proinflamatorios al aumentar la expresión de mPGES-1 en fibroblastos sinoviales [216]. La expresión de estos receptores en el cartílago artrósico humano aún no se ha estudiado en profundidad. En trabajos anteriores han sugerido que todos los receptores están presentes en el cartílago de crecimiento de la rata [223, 224]. Nuestros datos revelan que todos los receptores EPs se expresan en los condrocitos humanos artrósicos en cultivo, aunque la estimulación de los condrocitos con la IL-1 $\beta$  sólo produjo un incremento en la expresión de EP2 y de EP4. La expresión de EP1 y de EP3 no se modificó. En estos condrocitos, ni el tratamiento con CBX ni con DCF, modificó el aumento en la expresión de EP2 y de EP4 inducido por la IL-1 $\beta$ . En los estudios *in vivo*, hemos demostrado que los receptores EP1 y EP3 están presentes en el cartílago artrósico humano, aunque no hemos observado que el tratamiento con los AINES modifiquen su expresión. Sin embargo, en el cartílago de los pacientes tratados con CBX, observamos una disminución significativa en la expresión de los receptores EP2 y EP4 al compararlo con el cartílago de los pacientes CONTROL. En diferentes modelos de artritis se ha descrito que la cascada de señalización de la PGE<sub>2</sub> a través de los receptores EP2/EP4, está implicada en el proceso inflamatorio y en la degradación de la matriz extracelular en el cartílago y en el hueso [225, 226]. La reducción en la expresión de EP2/EP4 observada en el cartílago de los pacientes tratados con CBX podría participar en el control de la respuesta inflamatoria y de la progresión del daño del cartílago de estos pacientes. Por lo tanto, es importante evidenciar que la señalización de PGE<sub>2</sub> a través de los receptores EP2/EP4 puede tener un papel antiinflamatorio al menos en situaciones de inhibición o disminución en la concentración de PGE<sub>2</sub> [207].

El NO es otro de los mediadores implicados en la evolución de la artrosis y se ha relacionado con la destrucción del cartílago articular a través de diferentes mecanismos [77, 227, 228]. En este sentido, el NO puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz del cartílago, tales como el colágeno y proteoglicanos, aumentar la actividad de las MMP, incrementar la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reducir la síntesis del IL-1Ra,

inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis [78]. Se ha observado que el grado de lesión del cartílago puede estar directamente relacionado con la cantidad de NO producido por el tejido artrósico [229] y que en modelos animales la inhibición de la síntesis del NO en los tejidos de la articulación retarda la degeneración del cartílago [230]. De manera previa a la elaboración de este estudio, observamos que ni el ACF ni el CBX fueron capaces de disminuir ni la expresión ni la síntesis de la iNOS en la membrana sinovial de los pacientes incluidos en el ensayo clínico; Tampoco modificaron la concentración de NO en el líquido sinovial. Sin embargo, se ha observado que el condrocito es la principal fuente de NO [231], mientras que el tejido sinovial humano presenta una escasa capacidad para sintetizar y liberar NO [232]. Nuestros datos demuestran que tanto el ACF como el CBX disminuyen la expresión y la síntesis de la iNOS en el cartílago artrósico humano. Aún así, ninguno de los AINES utilizados en los experimentos *in vitro* consiguen disminuir significativamente ni la liberación de NO ni la síntesis de la iNOS en los condrocitos artrósicos humanos en cultivo. No obstante, los resultados de los estudios *in vivo* concuerdan con los datos existentes en cuanto a la disminución en la expresión de la iNOS tras el tratamiento con NS-398 en explantes de cartílago artrósico [206]. La aparente controversia existente entre los resultados *in vivo* e *in vitro* ya ha sido discutida por otros investigadores que sugirieron que los inhibidores de la COX-2 disminuyen el NO en los modelos de artrosis generados por inestabilidad, pero no en los generados con IL-1 $\beta$  [233]. Sin embargo, no podemos descartar que la reducción en la expresión y en la síntesis de la iNOS pudiera deberse a la disminución del estado inflamatorio general que se produce tras el tratamiento prolongado con CBX o ACF.

Nuestros datos sugieren que una terapia con AINES podría disminuir la concentración local de PGE<sub>2</sub>, además de por la inhibición en la actividad de las ciclooxigenasas, por la inhibición directa de la expresión génica y la síntesis proteica de las enzimas responsables de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en el cartílago. Además, la disminución en la expresión de los receptores EP2/EP4 podría ayudar a reducir la progresión del daño articular. El tratamiento con ACF o con CBX podría también disminuir la presencia de NO en el cartílago mediante la inhibición de la iNOS. Este estudio demuestra *in vivo* un efecto significativo de los AINES en la regulación de la expresión de la COX-2, la mPGES-1, los receptores EPs y de la iNOS en el cartílago humano artrósico.

En las articulaciones de pacientes con artrosis se observa un incremento en los niveles de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$  [234, 235]. Este incremento está relacionado con el daño en el cartílago [234, 236]. En este estudio mostramos que el tratamiento con CBX inhibe la expresión génica y la síntesis proteica del TNF- $\alpha$  en el cartílago de estos pacientes. El tratamiento con CBX también inhibe la expresión génica de la IL-1 $\beta$ , aunque no observamos ningún efecto sobre su síntesis proteica, probablemente debido a la desviación estadística. En los experimentos *in vitro*, tanto el CBX como el DCF inhibieron de forma significativa el aumento en la expresión de IL-1 $\beta$  de las células estimuladas, mientras que ninguno de los AINES modificó la expresión del TNF- $\alpha$ . Los resultados *in vitro* no parecen reflejar la situación *in vivo*, pero hay que tener en cuenta, como hemos explicado previamente, que debido a la gran complejidad de las rutas de señalización implicadas en los procesos inflamatorios y metabólicos que conducen a la destrucción de la articulación, es posible que los AINES presenten efectos diferentes *in vivo* e *in vitro*.

Algunos autores sugieren que las prostaglandinas no son la única diana en la acción antiinflamatoria de los AINES [237]. Nuestros datos demuestran que *in vivo* la respuesta de los condrocitos a los diferentes AINES en cuanto al control de la expresión de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  es diferente y no depende de la concentración local de PGE<sub>2</sub>. Se han descrito resultados similares con respecto al control de síntesis de la IL-6 en condrocitos por diferentes AINES [210]. En un estudio previo a este llevado a cabo en por nuestro grupo demostramos que los AINES incluidos en el trabajo tienen un perfil inhibitorio similar sobre la expresión y la síntesis de la COX-2 y de la PGE<sub>2</sub>, mientras el CBX y el ACF presentaban un perfil antiinflamatorio diferente en cuanto al control de la expresión génica de las citoquinas en la membrana sinovial de los pacientes incluidos en este estudio [238]. Aunque son necesarias investigaciones adicionales para aclarar el efecto de los AINES sobre los diferentes mediadores proinflamatorios y estructurales, los fármacos que pueden inhibir la expresión de citoquinas en las articulaciones artrósicas pueden ser particularmente atractivos en el desarrollo de nuevas terapias contra la artrosis.

Durante el proceso artrósico, los condrocitos y los fibroblastos sinoviales muestran diferente capacidad para responder ante una lesión, dando como resultado último la degeneración de todas las estructuras de la articulación. Durante la artrosis, los condrocitos y las células sinoviales producen factores proinflamatorios que se ven incrementados localmente y que inducen una larga cascada de acontecimientos que dirigen el daño en la articulación. En los pacientes con artrosis avanzada de rodilla, el tratamiento durante un periodo prolongado de tiempo con CBX o con ACF, mejora de forma similar el dolor y la función articular e inhibe la concentración de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial. Nuestros resultados indican que una terapia prolongada con fármacos que bloquean la PGE<sub>2</sub> disminuye la producción de la misma no sólo por la inhibición directa de la actividad de la COX-2, sino también por la disminución en la expresión y en la síntesis de la COX-2 y de la mPGES-1 en la membrana sinovial y en el cartílago articular de los pacientes con artrosis. La disminución en la expresión y en la síntesis de la iNOS en el cartílago articular podría contribuir también en la reducción de la progresión de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el CBX y el ACF parecen tener un perfil antiinflamatorio diferente en cuanto al control de la síntesis de citoquinas tanto en la membrana sinovial como en el cartílago de pacientes con artrosis.

## **2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES ANGIOGÉNICOS EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.**

La artrosis se asocia con la pérdida del cartílago articular, la inflamación sinovial, el remodelado del hueso subcondral y la formación de osteofitos. La creación de nuevos vasos puede contribuir al desarrollo de todas estas alteraciones en la articulación enferma [56]. La angiogénesis es un proceso finamente regulado en el organismo [127] por diversos factores que inhiben o promueven su activación en función del estado de cada órgano o tejido [128].

En el cartílago articular convergen los procesos de regulación de la síntesis y degradación de la matriz extracelular y de la angiogénesis. El cartílago no calcificado adulto en condiciones normales carece de vasos sanguíneos. De

hecho, este tejido es hostil hacia la invasión vascular, probablemente por la composición de la matriz y la generación de factores antiangiogénicos por los condrocitos articulares [239]. Sin embargo, los condrocitos pueden inducir la invasión vascular en el cartílago articular y es, de hecho, un requisito previo para la osificación endocondral. En la osificación endocondral fisiológica, por ejemplo, durante el crecimiento de los huesos largos, los condrocitos se diferencian para convertirse en condrocitos hipertróficos, dejando tras de sí una matriz de cartílago que se mineraliza y se sustituye por hueso nuevo. La formación de osteofitos en las uniones entre el cartílago y la membrana sinovial, y el avance del hueso subcondral hacia el cartílago articular, ambos rasgos característicos de la artrosis, son producto de un proceso de osificación endocondral [240].

La confluencia de las vías moleculares que regulan la síntesis de matriz del cartílago, la inflamación y la angiogénesis hace difícil la comprensión de la contribución específica que tiene la creación de nuevos vasos sanguíneos en el cartílago durante la artrosis. A su vez, también se desconoce cual es el efecto de los diferentes tratamientos anti-artróticos sobre los mediadores pro y anti-angiogénicos que se expresan en el cartílago durante la enfermedad.

Algunos estudios recientes indican que el crecimiento de vasos sanguíneos desde el hueso subcondral hasta el cartílago articular que se produce durante la artrosis podría facilitar el desarrollo de esta patología [241]. Algunos autores sugieren que este desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en la articulación podría ser parte de un intento de reparación del organismo [242]. La mecánica y las consecuencias metabólicas de este proceso reparativo, en particular la invasión que acompaña a la angiogénesis, pueden contribuir a aumentar los síntomas y a la progresión de la enfermedad [242, 243]. Mapp y colaboradores han sugerido que la neovascularización del cartílago articular se produce, aparentemente, en las fases tempranas de la artrosis [241], lo que contribuye a pensar que efectivamente este proceso forma parte de un intento reparativo ante el insulto destructivo que iniciaría la enfermedad [244]. La imposibilidad de obtener muestras humanas en fases precoces de la artrosis ha dado lugar al estudio de modelos experimentales de la enfermedad en los que evaluar la angiogénesis en estas fases pre-clínicas. En cobayas de la raza "*Dunkin-Hartley*", la artrosis se desarrolla de forma espontánea, aunque el tiempo en el que estos animales desarrollan la enfermedad puede ser muy prolongado [241]. En estos animales es poco frecuente la aparición de vasos sanguíneos que cruzan el frente de calcificación desde el hueso subcondral hasta el cartílago, en contraste con lo observado en muestras humanas [241]. En un modelo de artrosis por inestabilidad en rata, en el que los cambios que se producen en el cartílago articular, el hueso subcondral y la membrana sinovial son similares a los descritos durante la artrosis humana, se ha descrito que la vascularización que se produce en la articulación de estos animales se asemeja a la observada en muestras humanas [241]. En este mismo modelo se ha comprobado que la invasión vascular en el cartílago articular es uno de los primeros cambios que se producen durante la artrosis, ya que las ratas artróticas muestran aumentos significativos en la vascularización del cartílago calcificado tan solo una semana después de la cirugía [16]. Este aumento en la vascularización se produce desde la primera hasta la sexta semana, y los niveles más altos de invasión vascular se producen en la segunda semana [16]. Después de la sexta semana, las diferencias en el número de vasos sanguíneos dejan de ser significativas al comparar las ratas artróticas con las ratas control [16].

Nuestro modelo de artrosis experimental en conejo es altamente reproducible y se asemeja a la artrosis humana en cuanto a las modificaciones que se producen en todas las estructuras de la articulación. Aunque en nuestros conejos con artrosis experimental no hemos medido todavía de forma directa el número de vasos que penetran en el cartílago, datos previos de nuestro grupo demuestran que la integridad del frente de calcificación se pierde, debido al cruce de vasos desde el hueso subcondral, a medida que la enfermedad progresa [245].

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un potente factor proangiogénico que también regula el metabolismo de los condrocitos. La presencia de este factor induce tanto la invasión de vasos sanguíneos como el remodelado y la osificación del cartílago hipertrófico en la artrosis [112]. El VEGF regula también la matriz extracelular del cartílago mediante el incremento en la síntesis de metaloproteasas y la inhibición de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), especialmente bajo condiciones de hipoxia [111, 119]. De hecho, la resistencia hacia la invasión vascular en el cartílago se ha relacionado con la generación de factores antiangiogénicos por los condrocitos articulares, incluido el TIMP [239]. La capacidad de VEGF para modificar el equilibrio entre las metaloproteasas y TIMP puede contribuir a la pérdida de la protección frente al crecimiento vascular que se observa en el cartílago artrósico.

Se ha demostrado que los osteoblastos, los condrocitos hipertróficos y los condrocitos articulares incrementan la síntesis de VEGF durante la artrosis, así como los fibroblastos y los macrófagos de la membrana sinovial [124]. Las citoquinas proinflamatorias, la hipoxia y el estrés mecánico modifican el fenotipo de los condrocitos en la artrosis [111], mediante la síntesis de VEGF [112, 113]. La hipoxia aumenta también la expresión de este factor de crecimiento en los condrocitos a través de la activación del factor nuclear HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-induced factor-1 $\alpha$* ). Tanto el VEGF como HIF-1 $\alpha$  se expresan más en el cartílago artrósico que en el de individuos sanos [122, 124, 246, 247]. Además, se ha demostrado que ambos mediadores co-localizan en los condrocitos articulares de pacientes con artrosis [117].

Nuestros datos muestran que en el modelo de artrosis experimental en conejos que hemos realizado, hay un incremento en la síntesis de VEGF en el cartílago de los conejos artrósicos en comparación con los conejos sanos, de forma similar a lo que otros autores han descrito en el cartílago artrósico humano [122-124]. El incremento en la síntesis de VEGF en el cartílago artrósico fue significativo a todos los tiempos de evolución estudiados, desde la tercera hasta la duodécima semana.

En esta tesis, hemos tratado de reproducir *in vitro* la inducción de VEGF en los condrocitos artrósicos con el fin de estudiar los mecanismos por los que se produce. Para ello, hemos estimulado las células con IL-1 $\beta$ , una citoquina que se encuentra incrementada localmente en el cartílago artrósico. Nuestros resultados muestran que la IL-1 $\beta$  aumenta la expresión VEGF en los condrocitos artrósicos humanos en cultivo, datos que coinciden con los resultados de otros autores ya publicados [118, 248]. También medimos la expresión de HIF-1 $\alpha$  en los condrocitos artrósicos en cultivo estimulados con esta citoquina. Como en el caso de VEGF, nuestros datos muestran que la expresión de este factor nuclear aumenta después de estimular las células con IL-1 $\beta$ , resultados que concuerdan con otros publicados previamente [118, 249].

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si el incremento en la concentración local de PGE<sub>2</sub> era responsable, al menos en parte, del incremento en la síntesis de VEGF y HIF-1 $\alpha$  en los condrocitos durante la artrosis. Como hemos mencionado anteriormente, a pesar de que en la actualidad se utilizan fármacos como los AINES durante prolongados periodos de tiempo, se desconoce el efecto que tienen estos sobre los mediadores neo-angiogénicos que se activan en el cartílago durante la artrosis, entre ellos, VEGF y HIF-1 $\alpha$ .

En otros ámbitos, como en estudios sobre diferentes tipos de cáncer, varios trabajos relacionan el aumento en la síntesis de PGE<sub>2</sub> con el incremento de la angiogénesis [132-134, 250]. Estos autores consideran que el aumento en la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en muchos tipos de cáncer es el resultado del aumento en la actividad de la COX-2 que se produce en numerosos tumores [251-253]. De hecho, diversos estudios sugieren una relación entre los niveles de COX-2 y el aumento de factores angiogénicos, en particular de VEGF y HIF-1 $\alpha$ . Los niveles de VEGF se correlacionan con los de la COX-2 en cáncer de esófago, colon, pulmón, estomago, etc. [132, 134, 250, 254]. Varios investigadores han empleado tratamientos con distintos AINES en diferentes tipos de cáncer para comprobar si disminuyen los niveles de VEGF y con ellos, la angiogénesis. Una línea celular de cáncer de colon transfectada con COX-2, aumentó la producción de VEGF. Este aumento se inhibió por el tratamiento con NS398, un inhibidor específico de la COX-2 [255]. Se observaron efectos similares en células de cáncer de páncreas [135]. Otros AINES también tuvieron efectos parecidos [256]. Huang y sus colaboradores sugirieron una relación entre la COX-2, la PGE<sub>2</sub> y la producción de VEGF, posiblemente a través de HIF-1 $\alpha$ , utilizando una línea celular de cáncer gástrico [132]. En estas investigaciones se muestra que los AINES reducen la producción de factores de crecimiento angiogénico como el VEGF.

Los datos que obtuvimos en el estudio de la expresión de VEGF y de HIF-1 $\alpha$  en el cartílago de los pacientes artrósicos tratados con AINES en comparación con pacientes no tratados, muestran que ninguno de los AINES empleados consigue disminuir la expresión de HIF-1 $\alpha$  ni de VEGF.

Aunque en algunos tumores los niveles de COX-2 se correlacionan con los de VEGF, esto no demuestra una relación causa efecto. De hecho, estos aumentos pueden ocurrir en paralelo. Los estudios de transfección de células tumorales con COX-2 mostraban que el aumento de VEGF que se producía era bloqueado por los AINES [255]. Sin embargo, es posible que en la naturaleza haya múltiples vías implicadas por lo que probablemente la inhibición de la actividad de una sola enzima no sea suficiente. Es sabido que los AINES a dosis altas tienen efectos distintos de la inhibición de la COX. Por ejemplo, la inhibición de NF $\kappa$ B por el CBX [237] ocurre únicamente a dosis altas. En los estudios *in vitro* sobre la regulación de VEGF por los AINES existe una gran disparidad entre las concentraciones de los AINES utilizadas. En muchos casos las dosis son tremendamente superiores a las utilizadas en células de la articulación y en los experimentos *in vitro* se han utilizado concentraciones supra-fisiológicas que pueden alterar las respuestas.

Otro aspecto que podría explicar la disparidad de nuestros resultados en pacientes tratados con AINES en comparación con las células cancerosas es la propia naturaleza de nuestro estudio. En el caso de los pacientes, se trata de una enfermedad crónica en un estadio ya muy evolucionado. Si, como se ha mencionado más arriba, los

mediadores neo-angiogénicos se incrementan en el cartílago en las primeras etapas de la enfermedad, es posible que en estos pacientes no se pueda apreciar el incremento en la síntesis de VEGF en el momento de nuestro estudio. En nuestro laboratorio no disponemos hasta el momento de cartílago sano procedente de muestras humanas, por lo que no podemos saber si el VEGF se encuentra estimulado a este tiempo de evolución de la enfermedad.

Otra circunstancia a tener en cuenta es que los pacientes con artrosis tomaron los AINES durante un periodo de tres meses, por lo que es posible que tampoco esta situación sea comparable a un tratamiento agudo con AINES sobre células tumorales en monocapa.

Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si, en condrocitos en cultivo, la concentración de PGE<sub>2</sub> podía regular la síntesis de los mediadores angiogénicos, para lo que estimulamos los condrocitos con IL-1 $\beta$  y después los tratamos con diferentes AINES y SYSADOAS, fármacos anti-artrósicos que inhiben la síntesis de PGE<sub>2</sub>. Nuestros datos muestran que el tratamiento con AINES clásicos y con inhibidores selectivos de la COX-2 no inhibe el aumento en la expresión y en la síntesis de HIF-1 $\alpha$  provocado por la IL-1 $\beta$  en los cultivos de condrocitos artrósicos humanos.

Estos datos concuerdan con los obtenidos en el cartílago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. No existen estudios anteriores que relacionen los niveles de expresión y de síntesis de HIF-1 $\alpha$  con el uso de AINES en el cartílago articular durante la artrosis, y solo uno emplea un inhibidor selectivo de la COX-2, el NS398, en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. En este estudio, coincidiendo con nuestros datos, el NS398 no tuvo ningún efecto sobre los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  [257]. Podemos encontrar estudios en cultivos de otros tipos celulares en los que el tratamiento con AINES inhibe la expresión y la síntesis de HIF-1 $\alpha$ , pero las concentraciones de los AINES empleadas son como mínimo supra-fisiológicas [258-260].

Sin embargo, el tratamiento de los condrocitos humanos en cultivo con SG y con CS inhibe la presencia de HIF-1 $\alpha$  en el núcleo de los condrocitos estimulados por la IL-1 $\beta$ , según nuestros resultados. El mecanismo por el que se produce esta inhibición se desconoce. Jee-Young Park y sus colaboradores publicaron en febrero del presente año un artículo en el que disminuyen los niveles de HIF-1 $\alpha$  en células de cáncer de próstata tras el tratamiento con glucosamina [261]. Los autores de este estudio concluyeron que la glucosamina reducía los niveles de HIF-1 $\alpha$  por la inhibición de la traducción de proteínas. Los niveles celulares de HIF-1 $\alpha$  se controlan por el equilibrio entre la degradación y la síntesis. El tratamiento con glucosamina inhibió la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en las células de cáncer de próstata pero no afectó a los niveles de ARNm ni a la vida media de la proteína, por lo que sugirieron que la glucosamina podría disminuir la traducción de un subconjunto de los ARNm celulares entre los que se incluiría el de HIF-1 $\alpha$ . Un mecanismo similar se podría haber activado en nuestros experimentos, ya que ni el SG ni el CS inhibieron los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  y sin embargo los dos tratamientos inhibieron la síntesis proteica.

En cuanto a VEGF, los datos que hemos obtenido en los experimentos *in vitro*, muestran que todos los fármacos utilizados para tratar de inhibir el aumento en la expresión de este mediador provocado por la IL-1 $\beta$  en los condrocitos artrósicos humanos son efectivos, sin embargo, solo el SG y el CS consiguen inhibir el aumento en la

síntesis proteica. Los diferentes efectos que aparentemente muestran los AINES al inhibir la expresión génica de VEGF pero no su síntesis proteica pueden ser debidos a que VEGF está codificado por un gen que genera diferentes isoformas proteicas mediante *splicing* alternativo, como se explica en la introducción. El anticuerpo que hemos utilizado para medir la síntesis proteica en esta tesis reconoce específicamente la isoforma VEGF<sub>165</sub>, la más abundante. Estas modificaciones post-transcripcionales explican este aparente desacuerdo en nuestros datos, los AINES inhiben el aumento en la expresión génica de VEGF pero no en la síntesis proteica de la isoforma VEGF<sub>165</sub>. Como ya hemos mencionado, en algunos estudios en otros tipos celulares la producción de VEGF disminuye con el uso de AINES, pero las dosis empleadas en la mayor parte de esos trabajos son supra fisiológicas [135, 256], lo que hace difícil la comparación de esos estudios con el nuestro. Una posible explicación para la inhibición en la síntesis de VEGF que producen los SYSADOAS en nuestros experimentos implicaría al factor de traducción  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). El SG inhibe en condrocitos artrósicos la activación de este factor nuclear previniendo la degradación en el citoplasma celular de I $\kappa$ B $\alpha$ , una subunidad inhibitoria del NF $\kappa$ B, y evitando así la traslocación al núcleo de la subunidades p50 y p65 del factor nuclear [191]. Esta inhibición de la activación del NF $\kappa$ B por el SG también puede observarse *in vivo* en las células mononucleares periféricas de los conejos de un modelo animal de arterosclerosis agravado con artritis crónica [262]. Con el mismo modelo animal se demostró que también el CS reduce *in vivo* la activación de este factor nuclear [263]. Previamente, ya se había publicado que el CS era capaz de inhibir la activación del NF $\kappa$ B inducida por la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos en cultivo [264]. La activación del NF $\kappa$ B induce la expresión de un gran número de genes implicados en la regulación de una amplia variedad de respuestas biológicas, incluyendo VEGF [265]. En células de carcinoma renal, se puede relacionar el nivel de NF $\kappa$ B activado en el núcleo con la expresión de VEGF [266]. De esta manera, si tanto el SG como el CS son capaces de inhibir, al menos en parte, la activación del NF $\kappa$ B, podrían así disminuir la síntesis de VEGF.

El tratamiento con SG y con CS de los condrocitos artrósicos humanos en cultivo inhibió el aumento provocado por la IL1- $\beta$  tanto en la síntesis de VEGF como en la presencia de HIF-1 $\alpha$  en el núcleo celular, en comparación con las células estimuladas en ausencia de dichos fármacos. De esta forma, el mecanismo por el cual estos fármacos disminuyen la síntesis de VEGF en condrocitos artrósicos en cultivo podría ser, al menos en parte, a través de la inhibición en la activación del factor nuclear HIF-1 $\alpha$ .

A continuación, quisimos comprobar en el modelo experimental de artrosis en conejo si el tratamiento con SG era capaz de reducir el aumento en los niveles de VEGF que se producen durante la artrosis [122-124]. Como hemos mencionado anteriormente, los niveles de VEGF aumentaron en el cartílago de los conejos con artrosis. Algunos de los conejos artrósicos fueron tratados, de manera preventiva con SG, desde dos semanas antes de la intervención quirúrgica hasta su sacrificio. En el cartílago de estos conejos tratados, los niveles de VEGF disminuyeron en comparación a los niveles de VEGF del cartílago de los conejos artrósicos sin tratar. Estos resultados muestran que el SG es capaz de reducir la síntesis de VEGF *in vivo* en el cartílago artrósico, probablemente debido a su capacidad de inhibir parte de la activación del NF $\kappa$ B [191, 262], ya que los niveles de VEGF están relacionados con la activación del NF $\kappa$ B en varios tipos celulares en los que la inhibición de la activación este factor nuclear se vincula con una disminución en los niveles de varios factores angiogénicos, en particular de VEGF [266, 267].



### 3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PGE<sub>2</sub> SOBRE LA SÍNTESIS DE OPG/RANK/RANKL EN EL CARTÍLAGO ARTRÓSICO.

La característica principal de la artrosis es la degeneración del cartílago articular, pero además durante el proceso artrósico, simultáneamente se producen cambios en la cápsula articular, en los tejidos blando periarticulares, en la membrana sinovial y en el hueso subcondral [2]. La integridad del cartílago podría depender del hueso subcondral; En los años 80 se escribieron los primeros artículos en esta línea en los que se describía como las alteraciones del hueso influenciaban en la transmisión de fuerzas mecánicas y contribuían a la progresión del daño del cartílago [268]. Posteriormente se ha demostrado una relación directa entre el daño del cartílago y la pérdida de masa ósea en el hueso subcondral en un trabajo en el que la osteoporosis inducida en el hueso subcondral aumentó la gravedad de los daños en el cartílago en un modelo experimental en conejo [269].

Diferentes estudios microscópicos que describen un aumento del volumen del hueso, confirmaron la existencia de esclerosis en el hueso subcondral en fases avanzadas de la artrosis [12, 13], que probablemente refleje una respuesta adaptativa. Sin embargo, varios modelos experimentales con inestabilidad de la articulación por manipulación quirúrgica sugieren que fases tempranas de la artrosis pueden estar asociadas a un incremento en la resorción ósea [14-17]. De hecho, algunos datos indican que el remodelado en el hueso subcondral aumenta en pacientes con artrosis y en las primeras fases de la artrosis experimental [16, 18, 270]. Estas respuestas tempranas podrían ser iniciadas por citoquinas y metaloproteasas liberadas durante la destrucción del cartílago y el estrés del hueso [16, 18], ya que en artrosis experimentales, en la interfase entre el hueso y el cartílago se han detectado niveles elevados de TGF $\beta$ , MMP-9 y -13, BMPs y IL-6 [15, 18]. Además, se ha sugerido que distintos agentes que podrían inhibir la señal resortiva temprana en el hueso subcondral, como el alendronato o la osteoprotegerina, disminuirían el daño en el cartílago en modelos experimentales de artrosis [17, 18]. Estos datos indican una estrecha relación entre el hueso y el cartílago y sugieren que ambos tejidos pueden mantener una permanente comunicación tanto desde un punto de vista biomecánico, como intercelular e intermolecular. Sin embargo, los mediadores moleculares específicos de esta comunicación no se han descrito en profundidad.

A finales del siglo pasado se descubrió y se caracterizó RANKL, una citoquina esencial para la activación osteoclástica. Este descubrimiento, junto con el de su receptor, RANK, y de OPG, un receptor señuelo soluble para RANKL, han determinado un nuevo criterio molecular y celular sobre la resorción ósea y la homeostasis del hueso en general [137, 138]. RANKL es una proteína transmembrana que pertenece a la súper familia de los receptores de TNF y se expresa en los precursores hematopoyéticos de los osteoblastos, en los osteoblastos maduros, en los condrocitos y en otras células de la articulación en presencia de citoquinas como la IL-1 y la IL-6 [137, 143]. RANKL modula la diferenciación y la activación de los osteoclastos gracias a la unión con su receptor RANK, localizado en los precursores de los osteoclastos y en los osteoclastos maduros [139, 144, 148]. OPG es una proteína con homología con los miembros de la familia de los receptores del TNF producida y liberada por células estromales y otros tipos celulares incluido el osteoblasto, y actúa como un receptor señuelo soluble para RANKL compitiendo con

RANK; En consecuencia, OPG es un eficaz inhibidor de la activación y maduración de los osteoclastos *in vivo* e *in vitro* [139, 144, 148].

El sistema OPG/RANK/RANKL es el principal sistema de remodelado del hueso, aunque también se expresa en condrocitos [143, 149, 150]. En los condrocitos, la función y la regulación de este sistema siguen siendo en gran parte desconocidas. La regulación de OPG y de RANKL en los osteoblastos del hueso subcondral es diferente dependiendo de la concentración de PGE<sub>2</sub> liberada por estas células [151, 152]. En cambio, el efecto de la PGE<sub>2</sub>, o el efecto de la inhibición de ésta sobre la regulación de OPG y RANKL en el cartílago de pacientes con artrosis no se han descrito hasta ahora, aunque la PGE<sub>2</sub> es uno de los principales objetivos en el tratamiento contra la artrosis.

A pesar de la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos por los que se destruye el cartílago y el hueso durante la artrosis, es evidente que la osteoclastogénesis y la activación de la unión de la membrana sinovial con el cartílago pueden contribuir a la remodelación de la matriz ósea en pacientes con artrosis [271-273]. Además, el líquido sinovial de pacientes artrósicos induce resorción ósea por medio de la activación del sistema OPG/RANK/RANKL [272]. Todo esto nos permite especular con que la síntesis y la liberación de OPG y de RANKL desde los condrocitos pudieran contribuir también en el remodelado óseo mediante la maduración y activación de los osteoclastos de la sinovial.

En esta tercera y última parte de la tesis, hemos demostrado que el tratamiento con CBX, un inhibidor selectivo de la COX-2 empleado habitualmente en el tratamiento contra la artrosis, modifica la expresión y la síntesis de RANKL en el cartílago de pacientes con artrosis avanzada de rodilla. Así mismo, en la primera parte de la tesis, demostramos que el tratamiento con este AINE inhibe la concentración de PGE<sub>2</sub> en el líquido sinovial de pacientes con artrosis, y que en el cartílago de esos pacientes artrósicos también está inhibida la COX-2 y la mPGES-1 en comparación con los pacientes del grupo CONTROL que no recibieron CBX. Aunque no hemos medido la concentración de PGE<sub>2</sub> en el cartílago, presumiblemente el tratamiento con celecoxib provoca una disminución local de este metabolito; Por lo tanto, la reducción de la concentración de PGE<sub>2</sub> en las articulaciones de los pacientes parece estar acompañada por una inhibición paralela de la señal resorptiva mediada por el ratio OPG/RANKL. Creemos que esta es la primera descripción de un efecto *in vivo* del tratamiento con un AINE en el sistema OPG/RANKL en el cartílago humano.

Las variaciones en el ratio OPG/RANKL observadas son debidas a los cambios ocasionados por el tratamiento con CBX en la expresión y la síntesis de RANKL, ya que la expresión y la síntesis de OPG no se modifica con este tratamiento. También medimos en el cartílago de los pacientes la expresión de RANK, pero no observamos ninguna diferencia entre los pacientes tratados con CBX y los pacientes del grupo CONTROL. La expresión y la síntesis de RANKL podría ser el mediador clave de este sistema en el cartílago articular artrósico, ya que es el único miembro del sistema que se modifica, a diferencia de OPG y de RANK. Es poco probable que las diferencias que encontramos en la expresión y la síntesis de RANKL en el cartílago de los pacientes sean debidas a distribución de los pacientes al comienzo del ensayo clínico, ya que en ese momento, tanto el dolor como la función articular en los pacientes pertenecientes a los grupos CONTROL y los tratados con CBX eran similares.

Aunque el tratamiento con agentes modificadores de la enfermedad modula la síntesis de OPG y de RANKL en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide [274-276], todavía no existen datos sobre la modulación de este sistema en el cartílago de pacientes con artritis reumatoide o con artrosis severa. En la membrana sinovial, el tratamiento induce un incremento en el ratio OPG/RANKL que se correlaciona con unos mejorados resultados radiológicos de los pacientes con artritis reumatoide [275, 277].

Para estudiar si la PGE<sub>2</sub> por sí sola puede modular el sistema OPG/RANKL en el cartílago o si los cambios en estos mediadores en el cartílago son el resultado de la disminución de la inflamación en los pacientes tratados con CBX como hemos demostrado en la primera parte de la tesis, hemos estudiado el efecto de la PGE<sub>2</sub> en la modulación del ratio OPG/RANKL en condrocitos artrósicos humanos en cultivo.

Aunque se incrementó la expresión y la síntesis tanto de OPG como de RANKL en los condrocitos en respuesta a la PGE<sub>2</sub>, el aumento en la expresión y en la síntesis de RANKL fue siempre superior al observado para OPG. Por lo tanto, la PGE<sub>2</sub> induce una clara disminución del ratio OPG/RANKL en los condrocitos artrósicos, principalmente debido al aumento en la expresión y la síntesis de RANKL. Tras el tratamiento con PGE<sub>2</sub>, los osteoblastos, las células estromales y los fibroblastos también incrementan la expresión de RANKL, [278-280]. Sin embargo, hasta ahora no se había examinado la inducción directa de RANKL por PGE<sub>2</sub> en condrocitos. La PGE<sub>2</sub> es uno de los mediadores que más influye en la formación y en la resorción del hueso [281-283]. Aunque comúnmente asociamos la PGE<sub>2</sub>, tanto *in vitro* como *in vivo*, a la resorción ósea por su capacidad de aumentar el número y la actividad de los osteoclastos [284], también hay algunas evidencias de que la PGE<sub>2</sub> puede inducir la formación de hueso [284-286]. Nuestros datos confirman resultados previos sobre los osteoblastos del hueso subcondral y la liberación de RANKL de forma dependiente a la PGE<sub>2</sub> [151]. El CBX también inhibe la formación de osteoclastos en un modelo de ratón transgénico IL- $\alpha$  [287].

Los diferentes efectos que induce la PGE<sub>2</sub> en el cartílago y en el hueso pueden depender, como hemos explicado previamente, de su unión a los diferentes receptores específicos de la superficie celular, los receptores EPs, cada uno con diferentes vías de transducción de señales intracelulares. En la primera parte de la tesis demostramos que los cuatro receptores EPs se expresan en el cartílago artrósico humano y en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. Los receptores EP2 y EP4 han resultado ser esenciales en cuanto a la formación y resorción del hueso en términos de actividad y de maduración de los osteoclastos [70, 283, 285, 288], mediante la señal resortiva inducida por la PGE<sub>2</sub>. En osteoblastos, mediante la activación de los receptores EP2 y EP4 inducida por PGE<sub>2</sub>, también se induce una señal resortiva por la modulación de la síntesis de OPG y de RANKL [281]. En los condrocitos artrósicos humanos en cultivo, nuestros resultados muestran que la activación de los receptores EP2 y EP4 inducida por la PGE<sub>2</sub> produce un aumento en la expresión y en la síntesis de los mediadores OPG y RANKL, aunque el aumento de RANKL fue siempre superior al observado para OPG; Por lo tanto, la activación de los receptores EP2/EP4 en el cartílago podría mediar en una señal resortiva inducida por la PGE<sub>2</sub>.

Además de la PGE<sub>2</sub>, la concentración local de citoquinas proinflamatorias también podría ser responsable de la disminución de la expresión y síntesis de RANKL que se observa en el cartílago de los pacientes tratados con CBX.

En la primera parte de la tesis demostramos que el tratamiento con CBX inhibe la expresión de la IL-1 $\beta$  y la expresión y la síntesis del TNF $\alpha$  en el cartílago de estos pacientes y con anterioridad a esta tesis demostramos que ambas citoquinas también están inhibidas en la membrana sinovial [238]. En condrocitos humanos se ha demostrado que la IL-1 $\beta$  induce OPG y RANKL [150]. De acuerdo con estos resultados, tratamientos con antiinflamatorios en pacientes con artritis reumatoide aumentan el ratio OPG/RANKL en el tejido sinovial [275, 277].

En el cartílago de los pacientes incluidos en el ensayo clínico estudiamos la localización tanto de OPG como de RANKL. Observamos que las dos proteínas se localizan en todas las zonas del cartílago severamente dañado como consecuencia de la artrosis. La localización de OPG y de RANKL de nuestros cortes histológicos está en claro contraste con tinciones observadas con anterioridad en pacientes sanos y con artrosis leve [150]. En nuestros cortes, encontramos tinciones positivas para los dos mediadores, tanto en el interior celular como en el medio extra celular, lo que supone que estas proteínas pueden ser sintetizadas y liberadas desde los condrocitos hialinos. Previamente, se ha demostrado que el RANKL exógeno no activa el factor nuclear de transcripción kappa B (NF $\kappa$ B) ni estimula la expresión de genes que codifican mediadores pro-inflamatorios en condrocitos humanos [150]. Sin embargo, es posible que los condrocitos artrósicos respondan a aumentos locales de RANKL endógeno, modulando vías celulares u otros mediadores. Recientemente se ha publicado que los condrocitos hipertróficos regulan la osteoclastogénesis y la resorción del cartílago calcificado por los osteoclastos mediante la producción de RANKL [201]. Como se puede observar en las inmunohistoquímicas, existe señal positiva para RANKL en los condrocitos cercanos al frente de calcificación en el tejido peri-celular asociado a los condrocitos del cartílago, e incluso en los condrocitos encerrados en el cartílago calcificado. Además de promover la osteoclastogénesis, los condrocitos podrían promover la aparición de precursores de osteoclastos desde los vasos sanguíneos recién formados por medio de la expresión de RANKL. De hecho, se ha demostrado que RANKL tiene propiedades quimio-atrayentes en monocitos de sangre periférica [289, 290]. También hemos observado que RANKL se expresa cerca de los vasos sanguíneos que penetran en el cartílago artrósico, atravesando el frente de calcificación, que son capaces de llevar precursores desde la circulación hasta el hueso recién formado. Además, los condrocitos artrósicos secretan VEGF que dirige el estrechamiento del cartílago vascularizado y la expresión de metaloproteasas [124]. RANKL también ha sido descrito como un modulador de la respuesta angiogénica [291, 292].

Aunque necesitamos continuar las investigaciones para determinar el papel específico de la síntesis de RANKL en el cartílago, nuestros datos sugieren que RANKL podría mediar en una señal resortiva desde el cartílago que modularía, al menos en parte, la invasión vascular, la calcificación del cartílago y el metabolismo del hueso subcondral adyacente durante la artrosis.

La importancia de la inflamación sinovial y del reclutamiento del infiltrado celular en la fisiopatología de la artrosis es cada vez más evidente [21, 56, 238]. Aunque los mecanismos fisiopatológicos por los que se destruye el cartílago y el hueso en la artrosis son complejos, es evidente que la formación de osteoclastos y la activación del cartílago y la membrana sinovial pueden contribuir en el remodelado de la matriz del hueso en pacientes con artrosis [271, 272]. Además, el líquido sinovial de pacientes con artrosis induce resorción ósea a través de la activación del sistema

OPG/RANK/RANKL [272]. De este modo, se podría especular con que la síntesis y la liberación de OPG y RANKL desde los condrocitos también podrían contribuir al remodelado óseo promoviendo la maduración y la activación de los osteoclastos sinoviales.

Gracias al modelo de artrosis en conejo, estudiamos la síntesis de OPG y de RANKL en cartílago sano y pudimos compararlo con cartílago artrósico. De forma similar que el cartílago de los pacientes, no encontramos diferencias en la presencia de OPG. Sin embargo, observamos un aumento en la síntesis de RANKL en el cartílago de los conejos artrósicos en comparación con el de los sanos. Por lo tanto, el ratio OPG/RANKL está inhibido en los conejos artrósicos. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente en condrocitos humanos [293] y en otros tipos celulares como osteoblastos [294] y sugieren que la artrosis induce una señal resortiva en el cartílago mediante la modulación del ratio OPG/RANKL.

En resumen, nuestros datos indican que la artrosis induce una señal resortiva en el cartílago mediante la modulación del ratio OPG/RANKL en un modelo experimental de artrosis en conejo y que la PGE<sub>2</sub> regula *in vitro* la síntesis y la liberación por los condrocitos articulares de los principales mediadores del metabolismo óseo. El tratamiento a largo plazo con AINES inhibe la señal resortiva sintetizada por los condrocitos, especialmente a través de la síntesis de RANKL. Aunque todavía se desconoce el papel de este sistema en el metabolismo del cartílago artrósico, estas proteínas podrían modular la actividad de las células del hueso subcondral de forma paracrina.

## **VI. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES.

1. La inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> provocada por el tratamiento con CBX o con ACF mejoró de forma similar el dolor y la función articular de pacientes con artrosis de rodilla, e indujo una disminución similar en la expresión y síntesis de la COX-2, la mPGES-1 y la iNOS en el cartílago articular de estos pacientes en comparación con pacientes sin tratar. Estos datos sugieren que un tratamiento prolongado con estos fármacos disminuye la producción de PGE<sub>2</sub> no sólo por la inhibición directa de la actividad enzimática de las ciclooxigenasas, sino también por la inhibición de la expresión génica y de la síntesis proteica de las enzimas limitantes de este sistema en el cartílago. La disminución en la expresión y en la síntesis de la iNOS en el cartílago articular podría también contribuir en la reducción de la progresión de la respuesta inflamatoria.
2. Todos los receptores celulares de la PGE<sub>2</sub> se expresan en el cartílago articular de pacientes con artrosis de rodilla. La inhibición de la síntesis de la PGE<sub>2</sub> con el CBX reduce la expresión de los receptores EP2/EP4, por lo que la señalización de la PGE<sub>2</sub> a través de los receptores EP2/EP4 podría tener un papel antiinflamatorio en el cartílago de pacientes con artrosis, al menos en situaciones de inhibición o disminución en la concentración de la PGE<sub>2</sub>.
3. Los dos fármacos utilizados en el estudio, el CBX y el ACF, parecen tener diferente perfil antiinflamatorio en cuanto al control de la síntesis de citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el cartílago articular de pacientes con artrosis de rodilla.
4. Ninguno de los dos AINES modificó la expresión de VEGF, un mediador neoangiogénico que se expresa en el cartílago artrósico, en comparación con los pacientes sin tratar. Mediante estudios *in vitro* hemos comprobado que la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> inducida por la presencia de diferentes AINES (CBX, MXC, DCF e IND), no modifica la síntesis de los mediadores neoangiogénicos HIF-1 $\alpha$  y VEGF inducida por la IL-1 $\beta$  en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. Sin embargo, el tratamiento de los condrocitos con SG y con CS inhibió la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y de VEGF inducido por la IL-1 $\beta$ . Estos datos sugieren que la síntesis de estos mediadores no estaría relacionada con la concentración de PGE<sub>2</sub> en el cartílago artrósico.
5. En un modelo experimental de artrosis de rodilla en conejos, en el que hemos demostrado un incremento en la vascularización del cartílago artrósico similar al que está descrito en la artrosis humana, así como un incremento en la síntesis de VEGF, el tratamiento con SG fue capaz de disminuir la síntesis de VEGF en el cartílago de los conejos en comparación con los animales no tratados.

6. El tratamiento con CBX durante 3 meses de pacientes con artrosis de rodilla altera la presencia de los mediadores del metabolismo óseo OPG y RANKL en el cartílago, modificando la señal resortiva ósea que podría ser sintetizada en este tejido. Tanto OPG como RANKL se localizan en el cartílago articular de los pacientes, tanto en el condrocito como en la matriz pericelular. Además, RANKL se localizó en condrocitos cercanos al frente de calcificación.
7. Mediante estudios *in vitro* hemos demostrado que la PGE<sub>2</sub>, a través de sus receptores EP2/EP4, regula de forma directa la expresión y la liberación de éstos mediadores del metabolismo óseo en condrocitos artrósicos humanos en cultivo. La presencia de PGE<sub>2</sub> induce un incremento en la síntesis de OPG y, en mucha mayor medida, de RANKL, de forma dosis y tiempo dependiente.
8. El modelo de OA por inestabilidad que hemos realizado reproduce el incremento en la síntesis de RANKL en el cartílago articular que se produciría en las fases tempranas de la enfermedad, por lo que podría ser un modelo válido para comprobar el efecto de diferentes fármacos que modifiquen esta señal resortiva.
9. Aunque todavía se desconoce el papel del sistema OPG/RANK/RANKL en el metabolismo del cartílago artrósico, estas proteínas podrían modular la actividad de las células del hueso subcondral de forma paracrina.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Woolf AD, Pfleger B, *Burden of major musculoskeletal conditions*. Bull World Health Organ, 2003. **81**(9): p. 646-56.
2. Pelletier JP, *Etiopathogenesis of osteoarthritis. A textbook of rheumatology*. Arthritis and allied conditions, 2001: p. 1969-84.
3. Benton HP, Tyler JA, *Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **154**(1): p. 421-8.
4. Tyler JA, Benton HP, *Synthesis of type II collagen is decreased in cartilage cultured with interleukin 1 while the rate of intracellular degradation remains unchanged*. Coll Relat Res, 1988. **8**(5): p. 393-405.
5. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH, *Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide*. J Immunol., 1991. **147**(11): p. 3915-20.
6. Vincenti MP, Coon CI, Lee O, Brinckerhoff CE, *Regulation of collagenase gene expression by IL-1 beta requires transcriptional and post-transcriptional mechanisms*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): p. 4818-27.
7. Morisset S, Patry C, Lora M, de Brum-Fernandes AJ, *Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol*. J Rheumatol, 1998. **25**(6): p. 1146-53.
8. Stichtenoth DO, Thorén S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ, *Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 469-74.
9. Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F, *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(2): p. 284-9.
10. Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M, *Cell death in cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(1): p. 1-16.
11. Herrero-Beaumont G, Castañeda S, *Importancia del Hueso Subcondral y la Membrana Sinovial en la Patogenia y Tratamiento de la Artrosis* Reumatología, 2006. **22**(3): p. 79-80.
12. Kamibayashi L, Wyss UP, Cooke TD, Zee B, *Trabecular microstructure in the medial condyle of the proximal tibia of patients with knee osteoarthritis*. Bone, 1995. **17**(1): p. 27-35.
13. Beuf O, Ghosh S, Newitt DC, Link TM, Steinbach L, Ries M, Lane N, Majumdar S, *Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic trabecular bone structure in the human knee*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(2): p. 385-93.
14. Pastoureau PC, Chomel AC, Bonnet J, *Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(5): p. 466-73.
15. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, Laufer S, Martel-Pelletier J, *The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K*. Bone, 2004. **34**(3): p. 527-38.

16. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T, *Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis*. Bone, 2006. **38**(2): p. 234-43.
17. Kadri A, Ea HK, Bazille C, Hannouche D, Lioté F, Cohen-Solal ME, *Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2379-86.
18. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong le T, *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**(4): p. 1193-206.
19. Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD, *Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3178-84.
20. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF, *Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(7): p. 743-51.
21. Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T, *Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(2): p. 156-62.
22. Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H, *Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(2): p. 133-40.
23. Felson DT, *Clinical practice. Osteoarthritis of the knee*. N Engl J Med, 2006. **354**(8): p. 841-8.
24. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B, *Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(9): p. 1263-7.
25. Loeser RF, *Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1357-60.
26. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE, *Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(3): p. 585-94.
27. Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR, *Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(8): p. 2087-94.
28. Goldring MB, Berenbaum F, *The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide*. Clin Orthop Relat Res, 2004. **427 Suppl**: p. S37-46.
29. Goldring SR, Goldring MB, *The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, 2004. **427 Suppl**: p. S27-36.
30. Borzi RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A, *Chemokines in cartilage degradation*. Clin Orthop Relat Res, 2004. **427 Suppl**: p. S53-61.
31. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**(145-82).
32. Hemler M, Lands WE, *Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme*. J Biol Chem, 1976. **251**(18): p. 5575-9.

33. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P, *The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 16737-40.
34. Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA, *Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders*. Brain Res Rev, 2006. **52**(2): p. 201-43.
35. Bazan NG, Fletcher BS, Herschman HR, Mukherjee PK, *Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5252-6.
36. DeWitt D, Smith WL, *Yes, but do they still get headaches?* Cell, 1995. **83**(3): p. 345-8.
37. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13926-31.
38. Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA, *Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3*. J Pharm Pharm Sci, 2004. **7**(2): p. 217-26.
39. Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J, Moldovan F, Schrier D, Flory C, Martel-Pelletier J, *In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(6): p. 1582-93.
40. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL, *Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9886-93.
41. Shimpo H, Sakai T, Kondo S, Mishima S, Yoda M, Hiraiwa H, Ishiguro N, *Regulation of prostaglandin E(2) synthesis in cells derived from chondrocytes of patients with osteoarthritis*. J Orthop Sci, 2009. **15**(5): p. 611-7.
42. Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B, *Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7220-5.
43. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I, *Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32783-92.
44. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S, *Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(4): p. 355-65.
45. Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Okamoto R, Koshino T, Kawai S, *Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells*. J Rheumatol, 2002. **29**(9): p. 1836-42.
46. Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I, *Cellular prostaglandin E<sub>2</sub> production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37937-47.
47. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I, *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32775-82.
48. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB, *Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1231-7.

49. Goetzl EJ, An S, Smith WL, *Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases*. FASEB J, 1995. **9**(11): p. 1051-8.
50. Sahap Atik O, *Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990. **39**(4): p. 253-4.
51. Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA, *In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases*. Arthritis Rheum, 1993. **36**(10): p. 1444-50.
52. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H, *Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues*. Semin Arthritis Rheum, 2003. **33**(3): p. 155-67.
53. Matsuoka T, Narumiya S, *Prostaglandin receptor signaling in disease*. ScientificWorldJournal, 2007. **1**(7): p. 1329-47.
54. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP, *Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Lab Invest, 1994. **70**(6): p. 807-15.
55. Crofford LJ, *COX-2 in synovial tissues*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(4): p. 406-8.
56. Bonnet CS, Walsh DA, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(1): p. 7-16.
57. Dingle JT, *Prostaglandins in human cartilage metabolism*. J Lipid Mediat, 1993. **6**(1-3): p. 303-12.
58. DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K, Martel-Pelletier J, *Coordinate regulation of matrix metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 123-8.
59. Miyamoto M, Ito H, Mukai S, Kobayashi T, Yamamoto H, Kobayashi M, Maruyama T, Akiyama H, Nakamura T, *Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(9): p. 644-52.
60. Di Battista JA, Doré S, Morin N, He Y, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, *Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes*. J Cell Biochem, 1997. **65**(3): p. 408-19.
61. Lowe GN, Fu YH, McDougall S, Polendo R, Williams A, Benya PD, Hahn TJ, *Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line: role of second messengers*. Endocrinology, 1996. **137**(6): p. 2208-16.
62. Bunning RA, Russell RG, *The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(6): p. 780-4.
63. Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K, Itoh H, *Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(1): p. 17-24.
64. Mastbergen SC, Lafeber FP, Bijlsma JW, *Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(7): p. 801-8.
65. El Hajjaji H, Marcelis A, Devogelaer JP, Manicourt DH, *Celecoxib has a positive effect on the overall metabolism of hyaluronan and proteoglycans in human osteoarthritic cartilage*. J Rheumatol, 2003. **30**(11): p. 2444-51.

66. Mastbergen SC, Bijlsma JW, Lafeber FP, *Selective COX-2 inhibition is favorable to human early and late-stage osteoarthritic cartilage: a human in vitro study*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(6): p. 519-26.
67. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 205-29.
68. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD, *Prostanoid receptors: subtypes and signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 661-90.
69. Ono K, Akatsu T, Kugai N, Pilbeam CC, Raisz LG, *The effect of deletion of cyclooxygenase-2, prostaglandin receptor EP2, or EP4 in bone marrow cells on osteoclasts induced by mouse mammary cancer cell lines*. Bone, 2003. **33**(5): p. 798-804.
70. Li X, Okada Y, Pilbeam CC, Lorenzo JA, Kennedy CR, Breyer RM, Raisz LG, *Knockout of the Murine Prostaglandin EP2 Receptor Impairs Osteoclastogenesis in Vitro*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2054-61.
71. Fujino H, Regan JW, *EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(1): p. 5-10.
72. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J, *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1898-902.
73. Murad F, *Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development*. N Engl J Med, 2006. **355**(19): p. 2003-11.
74. Stamler JS, Lamas S, Fang FC, *Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism*. Cell, 2001. **106**(6): p. 675-83.
75. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
76. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB, *Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1237-47.
77. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M, *The role of nitric oxide in tissue destruction*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. **15**(5): p. 831-45.
78. López-Armas MJ, Carames B, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ, *Fisiopatología de la Artrosis: ¿Cuál es la actualidad?* Rev Esp Reumatol, 2004. **31**: p. 379-93.
79. Bredt DS, Snyder SH, *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 175-95.
80. Furchgott RF, *The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1984. **24**: p. 175-97.
81. Ignarro LJ, *Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. **30**(535-60).
82. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
83. Murad F, *What are the molecular mechanisms for the antiproliferative effects of nitric oxide and cGMP in vascular smooth muscle?* Circulation, 1997. **95**(5): p. 1101-3.
84. Shimokawa H, *Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 23-37.

85. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T, *The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006. **46**: p. 235-76.
86. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Tamura M, Tasaki H, Morishita T, Suda O, Ueno S, Toyohira Y, Nakashima Y, Yanagihara N, *Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor: involvement of the MEK/ERK pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2502-8.
87. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Yamashita T, Tanimoto A, Tasaki H, Ozumi K, Sabanai K, Morishita T, Suda O, Hirano H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Yanagihara N, *Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(1): p. 92-8.
88. Tsutsui M, *Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor*. *J Atheroscler Thromb*, 2004. **11**(2): p. 41-8.
89. Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, Samoilova VE, Thomas S, Wellner M, Baba HA, Robenek H, Schnekenburger J, Lerch MM, *Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase*. *FASEB J*, 2002. **16**(6): p. 500-8.
90. Park CS, Park R, Krishna G, *Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues*. *Life Sci*, 1996. **59**(3): p. 219-25.
91. Oke SL, Tracey KJ, *The inflammatory reflex and the role of complementary and alternative medical therapies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1172**(172-80).
92. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW, Grishko V, *Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009.
93. Mor A, Abramson SB, Pillingier MH, *The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction*. *Clin Immunol*, 2005. **115**(2): p. 118-28.
94. Dinarello CA, *The IL-1 family and inflammatory diseases*. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. **20**(5 Suppl 27): p. S1-S13.
95. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Toyama Y, Matsumoto H, Fujikawa K, Tada N, *Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice*. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 577-84.
96. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J, *Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(8): p. 1577-87.
97. Jacques C, Marjolaine Gosset, Francis Berenbaum, Cem Gabay, *The Role of IL-1 and IL-1Ra in Joint Inflammation and Cartilage Degradation*. *Vitamins and Hormones*, 2006. **74**: p. 371-403.
98. Shlopov BV, Gumanovskaya ML, Hasty KA, *Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 195-205.
99. Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J, *Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor*. *Lab Invest*. 1995 Sep,; 1995. **73**(3): p. 347-55.
100. Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP, *Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis*. *Immunol Cell Biol*, 2003. **81**(5): p. 354-66.
101. Burrage PS, Brinckerhoff CE, *Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors*. *Curr Drug Targets*, 2007. **8**(2): p. 293-303.

102. Berenbaum F, Jacques C, Thomas G, Corvol MT, Béréziat G, Masliah J, *Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on PGE2 production by articular chondrocytes does not involve PLA2 stimulation*. *Exp Cell Res*, 1996. **222**(2): p. 379-84.
103. van den Berg WB, *Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled*. *Springer Semin Immunopathol*, 1998. **20**(1-2): p. 149-64.
104. Dvorak HF, *Angiogenesis: update 2005*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1835-42.
105. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S, *Biology of vascular endothelial growth factors*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(12): p. 2879-87.
106. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO, *Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm*. *Cancer Lett*, 2007. **249**(2): p. 133-42.
107. Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J, *VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes*. *Bone*, 2007. **40**(3): p. 568-76.
108. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. *FASEB J*, 1999. **13**(1): p. 9-22.
109. McMahon G, *VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis*. *Oncologist*, 2000. **5 Suppl 1**: p. 3-10.
110. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(4): p. 777-94.
111. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R, *Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(1): p. 185-92.
112. Murata M, Yudoh K, Masuko K, *The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?* *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16**(3): p. 279-86.
113. Goldring MB, *Anticytokine therapy for osteoarthritis*. *Expert Opin Biol Ther*, 2001. **1**(5): p. 817-29.
114. Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R, *Hypoxia induces HIF-1alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes*. *J Orthop Res*, 2004. **22**(6): p. 1175-81.
115. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL, *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
116. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL, *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. *Genes Dev*, 1998. **12**(2): p. 149-62.
117. Pfander D, Cramer T, Swoboda B, *Hypoxia and HIF-1alpha in osteoarthritis*. *Int Orthop*, 2005. **29**(1): p. 6-9.
118. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K, *Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes*. *J Orthop Res*, 2006. **24**(7): p. 1544-54.
119. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K, *Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis*. *Histochem Cell Biol*, 2005. **123**(3): p. 275-81.
120. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation*. *J Cell Sci*, 2000. **113**: p. 59-69.



121. Sandal L, Heinegard D, Hering T, *Cell biology, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis*. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management, Lippincott Williams & Wilkins, 2007: p. 73-106.
122. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R, *The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1082-8.
123. Pfander D, Körtje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, Swoboda B, *Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(11): p. 1070-3.
124. Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y, *Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage*. Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 171-81.
125. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Beichler T, Dressler J, Schwab W, *Expression of the VEGF receptor-3 in osteoarthritic chondrocytes: stimulation by interleukin-1 beta and association with beta 1-integrins*. Histochem Cell Biol, 2003. **120**(3): p. 235-41.
126. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA, *Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2173-7.
127. Risau W, *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
128. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI, *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(2): p. 212-20.
129. Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R, *Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2645-50.
130. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N, *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 623-8.
131. Pufe T, Kurz B, Petersen W, Varoga D, Mentlein R, Kulow S, Lemke A, Tillmann B, *The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system*. Ann Anat, 2005. **187**(5-6): p. 461-72.
132. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT, *Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma*. J Biomed Sci, 2005. **12**(1): p. 229-41.
133. Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, Richmond A, Strieter R, Dey SK, DuBois RN, *CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 941-51.
134. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN, *Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1589-94.
135. Chu J, Lloyd FL, Trifan OC, Knapp B, Rizzo MT, *Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(1): p. 1-7.
136. Eibl G, Bruemmer D, Okada Y, Duffy JP, Law RE, Reber HA, Hines OJ, *PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(4): p. 887-97.

137. Hofbauer LC, Heufelder AE, *Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology*. J Mol Med, 2001. **79**(5-6): p. 243-53.
138. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
139. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ, *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease*. Endocr Rev, 2008. **29**(2): p. 155-92.
140. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ, *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
141. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3597-602.
142. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P, *Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20659-72.
143. Kwan Tat S, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, Martel-Pelletier J, *Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **Sep**.
144. Khosla S, *Minireview: the OPG/RANKL/RANK system*. Endocrinology, 2001. **142**(12): p. 5050-5.
145. Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A, *Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells*. Gene, 1997. **204**(1-2): p. 35-46.
146. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ, *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
147. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
148. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y, *IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 49-60.
149. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT, *Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues*. Bone, 1999. **25**(5): p. 525-34.
150. Komuro H, Olee T, Kühn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Achermann L, Lotz M, *The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand system in cartilage*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2768-76.
151. Kwan Tat S, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J, *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*, 2008. **26**(2): p. 295-304.
152. Tat SK, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Duval N, Martel-Pelletier J, *Differential modulation of RANKL isoforms by human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts: influence of osteotropic factors. Bone*, 2008. **43**(2): p. 284-91.
153. Steinmeyer J, Kontinen YT, *Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future. Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(2): p. 168-211.
154. Vane JR, *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol*, 1971. **231**(25): p. 232-5.
155. Brooks P, *Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med*, 1998. **104**(3A): p. 9S-13S.
156. Cryer B, Dubois A, *The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase--a review. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 1998. **56**(5-6): p. 341-61.
157. Cryer B, Kimmey MB, *Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med*, 1998. **105**(1B): p. 20S-30S.
158. Evans JM, McMahon AD, McGilchrist MM, White G, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM, *Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs and admission to hospital for upper gastrointestinal bleeding and perforation: a record linkage case-control study. BMJ*, 1995. **311**(6996): p. 22-6.
159. Freston JW, *Rationalizing cyclooxygenase (COX) inhibition for maximal efficacy and minimal adverse events. Am J Med*, 1999. **107**(6A): p. 78S-88S.
160. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M, *Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. Pharmacol Res*, 2001. **44**(6): p. 437-50.
161. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ, *Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. JAMA*, 2001. **286**(8): p. 954-9.
162. Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, Kiyota Y, Levin R, Mogun H, Avorn J, *Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. Circulation*, 2004. **109**(17): p. 2068-73.
163. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA, *Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. N Engl J Med*, 2005. **352**(11): p. 1092-102.
164. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnolli M, *Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. N Engl J Med*, 2005. **352**(11): p. 1071-80.
165. Melnikova I, *Future of COX2 inhibitors. Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(6): p. 453-4.
166. Dogné JM, Supuran CT, Pratico D, *Adverse cardiovascular effects of the coxibs. J Med Chem*, 2005. **48**(7): p. 2251-7.
167. Watson R, *European Medicines Agency gives favourable ruling on NSAIDs. BMJ*, 2006. **333**(7574): p. 873.
168. Furberg CD, *Decisions by regulatory agencies: are they evidence-based? Trials*, 2007.
169. Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, Zoer B, van Roermund PM, Bijlsma JW, Lafeber FP, *Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis. Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(4): p. 405-13.

170. Jaffré B, Watrin A, Loeuille D, Gillet P, Netter P, Laugier P, Saïed A, *Effects of antiinflammatory drugs on arthritic cartilage: a high-frequency quantitative ultrasound study in rats*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(6): p. 1594-601.
171. Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, *Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(12): p. 2893-902.
172. Huskisson EC, Berry H, Gishen P, Jubb RW, Whitehead J, *Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(10): p. 1941-6.
173. Buckland-Wright JC, MacFarlane DG, Lynch JA, Jasani MK, *Quantitative microfocal radiography detects changes in OA knee joint space width in patients in placebo controlled trial of NSAID therapy*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(5): p. 937-43.
174. Tindall EA, Sharp JT, Burr A, Katz TK, Wallemark CB, Verburg K, Lefkowitz JB, *A 12-month, multicenter, prospective, open-label trial of radiographic analysis of disease progression in osteoarthritis of the knee or hip in patients receiving celecoxib*. *Clin Ther*, 2002. **24**(12): p. 2051-63.
175. Uebelhart D, *Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16 Suppl 3**: p. S19-21.
176. Fajardo M, Di Cesare PE, *Disease-modifying therapies for osteoarthritis : current status*. *Drugs Aging*, 2005. **22**(2): p. 141-61.
177. Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazières B, Vignon E, Lequesne M, *Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(11): p. 2539-47.
178. Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y, Reginster JY, *Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis*. *Arch Intern Med*, 2003. **163**(13): p. 1514-22.
179. Verbruggen G, Goemaere S, Veys EM, *Systems to assess the progression of finger joint osteoarthritis and the effects of disease modifying osteoarthritis drugs*. *Clin Rheumatol*, 2002. **21**(3): p. 231-43.
180. Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ, *N Engl J Med Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis*, 2006. **354**(8): p. 795-808.
181. Herrero-Beaumont G, Román JA, Muñoz J, Blanco FJ, Beito P, Martín E, Paulino J, Marengo JL, Porto A, Laffon A, Araujo D, Figueroa M, Branco, *Effects of glucosamine sulfate on 6-month control of knee osteoarthritis symptom vs. placebo and acetaminophen: results from the Glucosamine Unum In Die Efficacy (GUIDE) trial* *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(9 Suppl): p. 1203.
182. Hochberg MC, *Nutritional supplements for knee osteoarthritis--still no resolution*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(8): p. 858-60.
183. Wang SX, Laverty S, Dumitriu M, Plaas A, Grynblas MD, *The effects of glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(5): p. 1537-48.
184. Bassleer C, Rovati L, Franchimont P, *Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. **6**(6): p. 427-34.

185. Dodge GR, Jimenez SA, *Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(6): p. 424-32.
186. Verbruggen G, *Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(2): p. 129-38.
187. Herrero-Beaumont G, Rovati LC, Castañeda S, Alvarez-Soria MA, Largo R, *The reverse glucosamine sulfate pathway: application in knee osteoarthritis*. *Expert Opin Pharmacother*, 2007. **8**(2): p. 215-25.
188. Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Kato T, Kamada T, Kawahara T, *Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatol Int*, 2007. **27**(3): p. 213-8.
189. Jang BC, Sung SH, Park JG, Park JW, Bae JH, Shin DH, Park GY, Han SB, Suh SI, *Glucosamine hydrochloride specifically inhibits COX-2 by preventing COX-2 N-glycosylation and by increasing COX-2 protein turnover in a proteasome-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(38): p. 27622-32.
190. Gouze JN, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, Kay JD, Levings PP, Patel KR, Saran JP, Watson RS, Ghivizzani SC, *Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(6): p. R173.
191. Largo R, Alvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, Calvo E, Sánchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(4): p. 290-8.
192. Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC, *Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF-kappaB signaling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(2): p. H515-23.
193. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW, *Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee*. *J Rheumatol*, 1988. **15**(12): p. 1833-40.
194. Benito MJ, Sánchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Hernández P, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(2): p. 311-9.
195. Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA, *Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(9): p. 1338-49.
196. Iwanaga T, Yamazaki T, Kominami S, *Regulation of the successive reaction catalyzed by rat neuronal nitric oxide synthase*. *Biochemistry*, 2000. **39**(49): p. 15150-5.
197. Chomczynski P, Sacchi N, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
198. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A, *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. *J Bone Joint Surg Am*, 1971. **53**(3): p. 523-37.
199. Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB, *COX-2, NO, and cartilage damage and repair*. *Curr Rheumatol Rep*, 2000. **2**(6): p. 447-53.
200. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT, *Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells*. *Endocrinology*, 1998. **139**(11): p. 4743-6.

201. Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, Boyce BF, *Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(3): p. 314-25.
202. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 529-43.
203. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS, *Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants* Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p. 1789-803.
204. Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB, *Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation*. Oncogene, 2004. **23**(57): p. 9247-58.
205. Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB, *Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2001-22.
206. Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, *Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase*. J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2509-19.
207. Largo R, Díez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Alvarez-Soria MA, Egido J, Herrero-Beaumont G, *EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1beta in synovial fibroblasts*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(10): p. 1197-204.
208. Henrotin Y, de Leval X, Mathy-Hartet M, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Dogné JM, Delarge J, Reginster JY, *In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators*. Inflamm Res, 2001. **50**(8): p. 391-9.
209. Mastbergen SC, Bijlsma JW, Lafeber FP, *Synthesis and release of human cartilage matrix proteoglycans are differently regulated by nitric oxide and prostaglandin-E2*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(1): p. 52-8.
210. Sanchez C, Mateus MM, Defresne MP, Crielaard JM, Reginster JY, Henrotin YE, *Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs*. J Rheumatol. 2002 Apr;29(4):772-82, 2002. **29**(4): p. 772-82.
211. Meade EA, Smith WL, DeWitt DL, *Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6610-4.
212. Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA, *Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31720-31.
213. Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Fahmi H, *Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes*. J Rheumatol, 2005. **32**(5): p. 887-95.
214. Westman M, Korotkova M, af Klint E, Stark A, Audoly LP, Klareskog L, Ulfgren AK, Jakobsson PJ, *Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1774-80.
215. Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB, Thirion S, *Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(9): p. 2829-38.

216. Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Beppu M, Aoki H, Kawai S, *Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(10): p. 2819-28.
217. Battle-Gualda E, Román Ivorra J, Martín-Mola E, Carbonell Abelló J, Linares Ferrando LF, Tornero Molina J, Raber Béjar A, Fortea Busquets J, *Aceclofenac vs paracetamol in the management of symptomatic osteoarthritis of the knee: a double-blind 6-week randomized controlled trial*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(8): p. 900-8.
218. Bort R, Ponsoda X, Carrasco E, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, *Metabolism of aceclofenac in humans*. *Drug Metab Dispos*, 1996. **24**(8): p. 834-41.
219. Yamazaki R, Kawai S, Matsuzaki T, Kaneda N, Hashimoto S, Yokokura T, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y, *Aceclofenac blocks prostaglandin E2 production following its intracellular conversion into cyclooxygenase inhibitors*. *Eur J Pharmacol*, 1997. **329**(2-3): p. 181-7.
220. Yamazaki R, Kawai S, Matsumoto T, Matsuzaki T, Hashimoto S, Yokokura T, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y, *Hydrolytic activity is essential for aceclofenac to inhibit cyclooxygenase in rheumatoid synovial cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **289**(2): p. 676-81.
221. Sugimoto Y, Narumiya S, *Prostaglandin E receptors*. *J Biol Chem*. 2007 Apr 20;282(16):11613-7, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
222. Takayama K, García-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA Jr, Libby P, *Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor*. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44147-54, 2002. **277**(46): p. 44147-54.
223. Brochhausen C, Neuland P, Kirkpatrick CJ, Nüsing RM, Klaus G, *Cyclooxygenases and prostaglandin E2 receptors in growth plate chondrocytes in vitro and in situ--prostaglandin E2 dependent proliferation of growth plate chondrocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(3): p. R78.
224. Del Toro F Jr, Sylvia VL, Schubkegel SR, Campos R, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z, *Characterization of prostaglandin E(2) receptors and their role in 24,25-(OH)(2)D(3)-mediated effects on resting zone chondrocytes*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(2): p. 196-208.
225. McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP, *The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(5): p. 651-8.
226. Honda T, Segi-Nishida E, Miyachi Y, Narumiya S, *Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis*. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 325.
227. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M, *Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 75-85.
228. Blanco FJ, Lotz M, *IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2*. *Exp Cell Res*, 1995. **218**(1): p. 319-25.
229. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M, *Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(9): p. 1632-8.
230. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, *Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(7): p. 1275-86.
231. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB, *The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase*. *J Exp Med*, 1995. **182**(6): p. 2097-102.

232. Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M, *The inducible production of nitric oxide by articular cell types*. Osteoarthritis Cartilage, 1994. **2**(3): p. 199-206.
233. Matsuda K, Nakamura S, Matsushita T, *Celecoxib inhibits nitric oxide production in chondrocytes of ligament-damaged osteoarthritic rat joints*. Rheumatol Int, 2006. **26**(11): p. 331-5.
234. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M, *Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis*. J Rheumatol, 1997. **24**(2): p. 365-71.
235. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J, *Cytokines and inflammation in cartilage degradation*. Rheum Dis Clin North Am, 1993. **19**(3): p. 545-68.
236. Marks PH, Donaldson ML, *Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee*. Arthroscopy, 2005. **21**(11): p. 1342-7.
237. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2057-72.
238. Alvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, Sanchez-Pernaute O, Calvo E, Hernandez M, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(8): p. 998-1005.
239. Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI, *Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis*. J Orthop Sci, 2003. **8**(6): p. 849-57.
240. Moskowitz RW, Goldberg VM, *Osteophyte evolution: studies in an experimental partial meniscectomy model*. J Rheumatol, 1987: p. 116-8.
241. Mapp PI, Avery PS, McWilliams DF, Bowyer J, Day C, Moores S, Webster R, Walsh DA, *Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(1): p. 61-9.
242. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF, *Angiogenesis in osteoarthritis and spondylosis: successful repair with undesirable outcomes*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(5): p. 609-15.
243. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
244. 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**(1): p. 224-36.
245. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(11): p. 878-86.
246. Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L, *Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2777-89.
247. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, *Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(4): p. R904-14.
248. Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, Nishioka K., *Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes*. Rheumatol Int, 2005. **26**(2): p. 93-8.



249. Guillén MI, Megías J, Clérigues V, Gomar F, Alcaraz MJ, *The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(9): p. 1323-8.
250. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E, *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer*. Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1339-47.
251. Wang D, Dubois RN, *Prostaglandins and cancer*. Gut, 2006. **55**(1): p. 115-22.
252. Backlund MG, Mann JR, Dubois RN, *Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2*. Oncology, 2005. **69**(Suppl 1): p. 28-32.
253. Mann JR, Backlund MG, DuBois RN, *Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(4): p. 202-10.
254. von Rahden BH, Stein HJ, Pühringer F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M, *Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5038-44.
255. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN, *Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells*. Cell, 1998. **93**(5): p. 705-16.
256. Palayoor ST, Tofilon PJ, Coleman CN, *Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in prostate cancer cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 3150-7.
257. Grimmer C, Pfander D, Swoboda B, Aigner T, Mueller L, Hennig FF, Gelse K, *Hypoxia-inducible factor 1alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(12): p. 4084-94.
258. Jones MK, Szabó IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS, *von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis*. FASEB J, 2002. **16**(2): p. 264-6.
259. Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, Man K, Chu AC, Kaneda K, Fan ST, *Regulatory role of vHL/HIF-1alpha in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **312**(2): p. 358-62.
260. Zhong H, Willard M, Simons J, *NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 activity: multiple-level effects involving cyclooxygenase-2 dependent and independent mechanisms*. Int J Cancer, 2004. **112**(4): p. 585-95.
261. Park JY, Park JW, Suh SI, Baek WK, *D-glucosamine down-regulates HIF-1alpha through inhibition of protein translation in DU145 prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(1): p. 196-101.
262. Largo R, Martínez-Calatrava MJ, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Effect of a high dose of glucosamine on systemic and tissue inflammation in an experimental model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(1): p. H268-76.
263. Herrero-Beaumont G, Marcos ME, Sánchez-Pernaute O, Granados R, Ortega L, Montell E, Vergés J, Egido J, Largo R, *Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(4): p. 843-51.
264. Álvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, Calvo E, Egido J, Herrero-Beaumont G, *Differential anticatabolic profile of glucosamine sulfate versus other anti-osteoarthritic drugs on human osteoarthritic chondrocytes and synovial fibroblast in culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**: p. S153.

265. Schmidt D, Textor B, Pein OT, Licht AH, Andrecht S, Sator-Schmitt M, Fusenig NE, Angel P, Schorpp-Kistner M, *Critical role for NF-kappaB-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 710-9.
266. Djordjević G, Matusan-Ilijas K, Sinozić E, Damante G, Fabbro D, Grahovac B, Lucin K, Jonjić N, *Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor-kappaB in renal cell tumors*. Croat Med J, 2008. **49**(5): p. 608-17.
267. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ, *Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis*. Oncogene, 2001. **20**(31): p. 4188-97.
268. Radin EL, Rose RM, *Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage*. Clin Orthop Relat Res, 1986. **Dec**(213): p. 34-40.
269. Calvo E, Castañeda S, Largo R, Fernández-Valle ME, Rodríguez-Salvanés F, Herrero-Beaumont G, *Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(1): p. 69-77.
270. Ratcliffe A, Seibel MJ, *Biochemical markers of osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 1990. **2**(5): p. 700-6.
271. Adamopoulos IE, Sabokbar A, Wordsworth BP, Carr A, Ferguson DJ, Athanasou NA, *Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption*. J Pathol, 2006. **208**(1): p. 35-43.
272. Andersson MK, Lundberg P, Ohlin A, Perry MJ, Lie A, Stark A, Lerner UH, *Effects on osteoclast and osteoblast activities in cultured mouse calvarial bones by synovial fluids from patients with a loose joint prosthesis and from osteoarthritis patients*. Arthritis Res, 2007. **9**(1): p. R18.
273. Ogawa K, Mawatari M, Komine M, Shigematsu M, Kitajima M, Kukita A, Hotokebuchi T, *Mature and activated osteoclasts exist in the synovium of rapidly destructive coxarthrosis*. J Bone Miner Metab, 2007. **25**(6): p. 354-60.
274. Catrina AI, af Klint E, Ernestam S, Catrina SB, Makrygiannakis D, Botusan IR, Klareskog L, Ulfgren AK, *Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 76-81.
275. Haynes D, Crotti T, Weedon H, Slavotinek J, Au V, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Ahern M, Smith MD, *Modulation of RANKL and osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis in response to disease-modifying antirheumatic drug treatment and correlation with radiologic outcome*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(7): p. 911-20.
276. Makrygiannakis D, af Klint E, Catrina SB, Botusan IR, Klareskog E, Klareskog L, Ulfgren AK, Catrina AI, *Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1463-72.
277. Lee CK, Lee EY, Chung SM, Mun SH, Yoo B, Moon HB, *Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor kappaB, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p. 3831-43.
278. Wei X, Xinping Zhang, Michael J Zuscik, M Hicham Drissi, Edward M Schwarz, Regis J O'Keefe *Fibroblasts Express RANKL and Support Osteoclastogenesis in a COX-2-Dependent Manner After Stimulation With Titanium Particles*. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 2005. **20**(7): p. 1136-48.
279. LIU XH, KIRSCHENBAUM A, YAO S, LEVINE AC, *Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 225-33.

280. Quinn JM, Horwood NJ, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ, *Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation*. J Bone Miner Res 2000. **15**(8): p. 1459-66.
281. LI X, PILBEAM CC, PAN L, BREYER RM, RAISZ LG, *Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice*. Bone, 2002. **30**(4): p. 567-73.
282. Miyaura C, Inada M, Suzawa T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T, *Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice*. J Biol Chem 2000. **275**(26): p. 19819-23.
283. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T, *The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs*. Endocrinology, 2000. **141**(4): p. 1554-9.
284. Raisz LG, *Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology*. Osteoarthritis and Cartilage, 1999. **7**(4): p. 419-421.
285. Samadfam R, Gallant MA, Miousse MC, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ, *Implication of prostaglandin receptors in the accumulation of osteoprotegerin in human osteoblast cultures*. J Rheumatol, 2006. **33**(6): p. 1167-75.
286. Woodiel FN, Fall PM, Raisz LG, *Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(9): p. 1249-55.
287. Niki Y, Takaishi H, Takito J, Miyamoto T, Kosaki N, Matsumoto H, Toyama Y, Tada N, *Administration of cyclooxygenase-2 inhibitor reduces joint inflammation but exacerbates osteopenia in IL-1 alpha transgenic mice due to GM-CSF overproduction*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 639-46.
288. Miyaura C, Inada M, Suzawa T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T, *Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E2 receptor E4-knockout mice*. J Biol Chem 2000. **275**(26): p. 19819-23.
289. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller-Ziegler L, Rossi Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW, *The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes*. FASEB J, 2003. **17**(12): p. 1751-3.
290. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ, *Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2309-16.
291. McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M, *Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function* Angiogenesis 2009;12:35-46, 2009. **12**(1): p. 35-46.
292. Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG, *Receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Blood, 2007. **15**(4): p. 1495-502.
293. Tat SK, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, Martel-Pelletier J, *Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009.
294. Sakao K, T.K., , Mazda O, Arai Y, Tonomura H, Inoue A, Saito M, Fujioka M, Takamiya H, Imanishi J, Kubo T, *Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13, and receptor activator of NF-kappaB ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone*. J Orthop Sci, 2008. **13**(3): p. 202-10.



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

- **MORENO-RUBIO J**, Herrero-Beaumot G, Tardío L, Alvarez-Soria MA, Largo R. "PGE2 modulates the synthesis of Osteoprotegerin an receptor activator of NF-kappaB ligand in the articular cartilage of patientns with osteoarthritis". Arthritis and Rheumatism. 2010. Vol: 62. Págs. 478-488. Índice de impacto (ISI): 7.677.
- Álvarez -Soria M A, Herrero-Beaumot G, **MORENO-RUBIO J**, Calvo E, Santillana J, Egido J, Largo R. "Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis". Osteoarthritis Cartilage. 2008. Vol: 16 (12) Págs. 1484-93. Índice de impacto (ISI): 4.082.

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

- Largo R, Roman-Blas JA, Sanchez-Pernaute O, **MORENO-RUBIO J**, Martinez-Calatrava MJ, Herrero-Beaumont G. "Chondroitin sulfate prevents synovial inflammation in an experimental model of chronic arthritis in rabbits" Osteoarthritis Cartilage. 2009. Índice de impacto (ISI): 4.082. In Press.
- Largo R, Martínez-Calatrava MJ, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, **MORENO-RUBIO J**, Aparicio C, Egido J, Herrero-Beaumont G. "Effect of glucosamine on systemic and tissue inflammation in an experimental model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis". Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. Vol: 297 (1) Págs. 268-276. Índice de impacto (ISI): 3.902
- Largo R, Sanchez-Pernaute O, Marcos M E, **MORENO-RUBIO J**, Aparicio C, Granado R, Ortega L, Egido J, Herrero-Beaumot G. "Chronic Arthritis Aggravates Vascular lesions In Rabbits With Atherosclerosis". A Novel Model Of Atherosclerosis Associated With Chronic Inflammation. Arthritis and Rheumatism. 2008. Vol: 58 (9) Págs: 2723-34 Índice de impacto (ISI): 7.751

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

- Denominación del evento: "14th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI"

Lugar de celebración y año: Montreal. Canada. 2009

Tipo de participación: Poster.

"PGE2 modulates the synthesis of OPG and RANKL in the articular cartilage of patients with knee osteoarthritis"

MORENO-RUBIO J, Herrero-Beaumot G, Tardío L, Bellido M, Largo R

- Denominación del evento: "American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting ASBMR"

Lugar de celebración y año: Denver. EEUU. 2009

Tipo de participación: Presentación oral

"PGE2 modulate the synthesis of OPG and RANKL in the articular cartilage of patients with knee osteoarthritis"

Largo R, MORENO-RUBIO J, Tardío L, Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "XIV Congreso de la sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral SEIOMM"

Lugar de celebración y año: Santander. España. 2009

Tipo de participación: Poster

"La prostaglandina E2 (PGE2) modula la síntesis de la osteoprotegerina (OPG) y RANKL en el cartílago de pacientes con artrosis de rodilla"

MORENO-RUBIO J, Herrero-Beaumont G, Tardío L, Bellido M, Largo R

- Denominación del evento: "13th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI"

Lugar de celebración y año: Roma. Italia. 2008

Tipo de participación: Poster.

"NSAIDs and SYSADOAs differently regulate the synthesis of neoangiogenesis mediators in human osteoarthritic chondrocytes in culture" MORENO-RUBIO J, Herrero-Beaumont G, Tardío L, Bellido M, Largo R

- Denominación del evento: "13th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI"

Lugar de celebración y año: Roma. Italia. 2008

Tipo de participación: Presentación oral

"Chondroitin sulfate prevents synovial inflammation in an experimental model of chronic arthritis, which might be mediated by the inhibition of the NF-kB dependent pathway" Largo R, Sánchez-Pernaute O, MORENO-RUBIO J, Marcos ME, Herrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "13th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI"

Lugar de celebración y año: Roma. Italia. 2008

Tipo de participación: Poster.

"Effect of N-acetylcysteine in the catabolic program of human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes in culture" Contrera-Blasco M, Largo R, MORENO-RUBIO J, Castañeda S., Herrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "8th Scientific advisory committee of the european society for clinical and economic aspects of osteoporosis and osteoarthritis ECCEO"

Lugar de celebración y año: Estambul. Turquía. 2008

Tipo de participación: Poster.

"NSAID treatment decreases cox-2 and mpgaes-1 production by osteoarthritic chondrocytes of patients with severe knee osteoarthritis" Largo R, Alvarez-Sora MA, MORENO-RUBIO J, Calvo E, Castañeda S, Herrero-Beaumot G

- Denominación del evento: "8th Scientific advisory committee of the european society for clinical and economic aspects of osteoporosis and osteoarthritis ECCEO"

Lugar de celebración y año: Estambul. Turquía. 2008

Tipo de participación: Poster.

"Action mechanisms of diacerhein on catabolic pathways of human osteoarthritic chondrocytes"

Largo R, MORENO-RUBIO J, Sanchez-Peranute O, Castañeda S, Herrero-Beaumot G

- Denominación del evento: "35th european symposium on calcified tissues"

Lugar de celebración y año: Barcelona. España. 2008.

Tipo de participación: Poster.

"Action mechanisms of diacerhein on catabolic pathways of human osteoarthritic chondrocytes"

Alvarez-Soria MA, Largo R, MORENO-RUBIO J, Sánchez-Pernaute O, castañeda S, Hrrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "35th european symposium on calcified tissues"

Lugar de celebración y año: Barcelona. España. 2008.

Tipo de participación: Poster.

"NSAID treatment decreases COX-2 and mPGES-1 production by osteoarthritic chondrocytes of patients with severe knee osteoarthritis. Largo R,. Alvarez-Soria MA, MORENO-RUBIO J, CalvoE, Castañeda S, Herrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "Formación básica en protección radiológica en laboratorios"

Lugar de celebración y año: Fundación Jiménez Díaz. 2007

Entidad/grupo organizador: Servicio de Protección Radiológica de la FJD.

Tipo de participación: Este curso comprende el manejo de isótopos radiactivos y el conocimiento práctico de las normas y medidas de seguridad necesarias para la correcta utilización de los isótopos radiactivos empleados en biología molecular y celular

- Denominación del evento: "Avances pronósticos y terapéuticos en osteoartrosis degenerativa"

Lugar de celebración y año: Agencia Laín Entralgo.2007

Entidad/grupo organizador: Agencia Laín Entralgo.2007

Tipo de participación: Oyente

- Denominación del evento: "World Congress on Osteoarthritis OARSI"

Lugar de celebración y año: Miami. Estados Unidos. 2007.

Tipo de participación: Presentación Oral.

"EP2/EP4 mediated PGE2 signalling induces the synthesis of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF-KAPPA B ligand (RANKL) in human osteoarthritic chondrocytes in culture"  
MORENO-RUBIO J, Herrero-Beaumont G, Tardío L, Largo R.

- Denominación del evento: "World Congress on Osteoarthritis OARSI"

Lugar de celebración y año: Miami. Estados Unidos. 2007.

Tipo de participación: Poster.

"Long term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGSE-1 production in the knee articular cartilage of patients with osteoarthritis" Largo R, Alvarez-Soria M, MORENO-RUBIO J, Calvo E, Herrero-Beaumont G.

- Denominación del evento: "World Congress on Osteoarthritis OARSI"

Lugar de celebración y año: Miami. Estados Unidos. 2007.

Tipo de participación: Poster.

"Diacerherin exerts a partial control on the catabolic program of human osteoarthritic chondrocytes but not on synovial fibroblast in culture" Alvarez-Soria M, MORENO-RUBIO J, Sánchez-Pernaute O, Herrero-Beaumont G.

- Denominación del evento: "71th annual meeting of the American college of rheumatology ACR"

Lugar de celebración y año: Boston. Estados Unidos. 2007

Tipo de participación: Poster.

"Glucosamine Prevents Systemic and Femoral Lesion Inflammation In An Experimental Model Of Atherosclerosis Associated To Chronic Arthritis" Largo R, Marcos ME, Sánchez-Pernaute O, MORENO-RUBIO J, Ortega L, Egido J, Herrero-Beaumont G.

- Denominación del evento: "XII Congreso de la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral SEIOMM"

Lugar de celebración y año: Valencia. España. 2007

Tipo de participación: Presentación Oral.

"La prostaglandina E2 (PGE2) induce la síntesis de OPG y RANKL en condrocitos humanos artrósicos en cultivo a través de sus receptores EP2/EP4" Largo R, MORENO-RUBIO J, Tardío L, Herrero-Beaumont G

- Denominación del evento: "70th annual meeting of the American college of rheumatology ACR 2006"

Lugar de celebración y año: Washington. Estados Unidos. 2006

Tipo de participación: Poster.

"Chronic arthritis aggravates vascular lesions in rabbits with induced atherosclerosis. A novel model for the study of secondary atherosclerosis" Largo R, Marcos ME, Sánchez-Pernaute O, Romero F, MORENO-RUBIO J, Egido J, Herrero-Beaumont G



• Denominación del evento: "Annual European congress of rheumatology EULAR 2005"

Lugar de celebración y año: Viena. Austria. 2005

Tipo de participación: Poster.

"Combination of two experimental models for the study of atherosclerosis associated to rheumatoid arthritis"

